



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes du développement de la moelle épinière humaine par la mise en place de modèles in vitro dérivés de cellules souches pluripotentes humaines

Vincent Mouilleau

► **To cite this version:**

Vincent Mouilleau. Etude des mécanismes du développement de la moelle épinière humaine par la mise en place de modèles in vitro dérivés de cellules souches pluripotentes humaines. Embryologie et organogenèse. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS407 . tel-04806205

**HAL Id: tel-04806205**

**<https://theses.hal.science/tel-04806205v1>**

Submitted on 27 Nov 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.

# Etude des mécanismes du développement de la moelle épinière humaine par la mise en place de modèles in vitro dérivés de cellules souches pluripotentes humaines

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay,  
préparée à l'Université Paris-SUD

École doctorale n°569  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Corbeil-Essonnes, le 26 Novembre 2019, par

**Vincent Mouilleau**

Composition du Jury :

Pr. Claire Legay UMR811, Université Paris-Descartes, Paris	Présidente
Dr. Sophie Bel-Vialar Centre de Biologie Intégrative, Toulouse	Rapporteuse
Dr Isabelle Cloëz-Tayarani Institut Pasteur, Paris	Rapporteuse
Dr Anselme Perrier Institut de Biologie François Jacob, Fontenay-aux-Roses	Examineur
Dr Julien Falk Institut NeuroMyoGène, Lyon	Invité
Dr Cécile Martinat UEVE/INSERM U861, I-STEM, Corbeil-Essonnes	Directeur de thèse
Dr Stéphane Nédélec UMR-S 839 Inserm / UPMC, IFM, Paris	Co-Directeur de thèse



## Résumé

La mise en place des circuits moteurs dépend, au cours du développement, de la spécification de plusieurs milliers de types de motoneurones (MNs) distincts générés à différentes positions le long de l'axe rostro-caudal (R-C) de la moelle épinière. En fonction de leur localisation, ces MNs acquièrent des propriétés particulières telles que la position des corps cellulaires ou encore la spécificité de leurs projections axonales vers leur muscle cible. La diversification des MNs est en correspondance avec différents segments de la moelle épinière : cervical, brachial, thoracique, lombaire et sacré dans lesquels ils s'organisent en colonnes motrices, chacune innervant un groupe de muscles cibles ayant des fonctions motrices communes. Au sein de ces colonnes, les MNs forment des pools moteurs correspondant aux MNs innervant un même muscle. La formation de cette diversité dépend très largement d'une grande famille de facteurs de transcription : les gènes Hox. Lors du développement, ces sous-types de MNs sont progressivement spécifiés depuis la partie rostrale vers la partie caudale, des premiers formés, les MNs cervicaux, aux derniers générés, les MNs sacrés. Cette spécification temporelle provient de la différenciation progressive de progéniteurs axiaux qui subissent des changements séquentiels de leur compétence au fil du temps. Cependant, les mécanismes à l'origine de ce changement de compétence restent mal connus. Leur étude *in vivo* est limitée ; chez les animaux, dû à la complexité des systèmes vivants (cellules rares au sein de structures complexes, influence de plusieurs signaux extrinsèques sur la population d'intérêt) et impossible chez l'Homme. Pour aborder cette question, j'ai donc tiré parti des possibilités offertes par la différenciation *in vitro* des cellules souches pluripotentes humaines. J'ai d'abord caractérisé, chez l'embryon humain, le profil d'expression des facteurs de transcription HOX qui identifient les sous-types de MNs spinaux situés à différents niveaux R-C de la moelle épinière. Ensuite j'ai développé une stratégie pour générer à partir des cellules souches humaines des progéniteurs ayant les caractéristiques de progéniteurs axiaux. Ceci m'a permis de montrer que ces cellules changent de compétence au cours du temps comme dans les embryons de modèles vertébrés et peuvent générer séquentiellement différentes populations de MNs. Ce modèle m'a alors permis d'identifier les mécanismes sous-jacents à ces changements de compétence et de les manipuler pour générer, pour la première fois de manière efficace, différentes populations de MNs humains. Ces populations de MNs présentant des vulnérabilités différentes dans des maladies comme l'amyotrophie spinale ou la sclérose amyotrophique latérale, l'accès à ces cellules pourrait permettre la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le futur.

*La fonction de notre intelligence est de nous engager  
dans les directions de la connaissance  
(Georges Clémenceau, Au soir de la pensée, 1927)*



## Remerciements

*Je tiens à remercier chaudement Stéphane Nédelec et Cécile Martinat pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes respectives et pour m'avoir encadré pendant ma thèse. Merci pour votre savoir scientifique que vous avez partagé avec moi tout au long de ma thèse. Merci pour la chance du cadre de travail que vous m'avez fourni, à savoir être à l'écoute, me conseiller, me guider et aussi avoir su m'encourager et vous être totalement impliqués lors de ma thèse. Quand je vois le travail que vous fournissez, et avec les différentes responsabilités que vous avez (notamment gérer une équipe) et toujours être aussi passionnés, dynamiques et impliqués dans votre travail, je vous dis bravo et merci. Car c'est en ayant des mentors aussi passionnés que l'on se stimule dans le travail.*

*Je remercie Jean-Antoine Girault, Marc Peschanski et Raymond Zakhia pour m'avoir ouvert les portes de leurs instituts et m'avoir donné les moyens d'effectuer mes travaux dans un cadre équipé et confortable.*

*Je tiens à remercier les membres de mon jury, Claire Legay, Sophie Bel-Vialar, Isabelle Cloëz-Tayarani, Anselme Perrier, Julien Falk pour leur intérêt envers mon travail et pour avoir accepté de le lire et de l'évaluer. Leur retour sera également pour moi un moyen de remettre en question mes résultats pour les améliorer et développer de nouvelles pistes.*

*Merci également à Vanessa Ribes et Fiona Francis, pour leurs conseils avisés lors de mon comité de mi-thèse.*

*Merci également à toutes les personnes d'ISTEM et de l'Institut du Fer à Moulin. Ces années ont été ponctuées de rencontres avec des personnes toujours plaisantes et qui m'ont permis de me sentir à l'aise dans mon travail et en dehors. J'ai apprécié les échanges scientifiques, leur vision et approche de la science qui m'ont permis de voir la multitude de manières d'apprécier la recherche et ses découvertes. Merci notamment à Michel, Jacquie, Sandrine, Sandra, Laetitia, Yves, Florine pour ces moments de travail et de rigolade. Merci à Pascal, avec son humour et sa culture qui va d'un extrême à l'autre. Merci à Jacquie d'avoir souvent fait la fermeture du labo avec moi. Merci à Julien, qui m'a remonté le moral en période de doute et m'a appris la fixation des cellules ! Et merci à Léa, la maman qui a bichonné les cellules sur laquelle la majorité de ma thèse repose et qui m'a montré ce qu'est l'organisation (bon après je n'ai pas encore totalement pris le coup de main).*

*Comme dans toutes quêtes, le personnage principal n'atteint jamais son but seul. Il dépend de plusieurs compagnons de voyage qui deviennent des amis. J'en ai eu plusieurs, difficile de tous les nommer bien qu'ils m'ont tous aidés. Mais parmi eux merci profondément à l'équipe d'ISTEM : Florian dont les têtes à têtes au labo le week-end ont été nombreux, Déborah ma super voisine ! Margot dit la main verte et foie d'acier, Marie (titi), Gurvan (Infected Mushroom, Carmina burana, lucha libre...s'agirait de grandir !), et surtout Sylvain mon sempai de l'équipe (Ah c'est sûr, c'est pas Joe le Rigolo !), et Valentin mon compagnon de thèse qui a évolué en même temps que moi et m'a accompagné dans les derniers stades (ui ! ui !). Les moments passés au laboratoire, à la « station-service », sur le parcours des 25 bosses ou en VENDEE resteront mémorables. Merci à la nouvelle et prometteuse génération à venir qui a pris le relais et m'a accompagné, aidé (et supporté, bon courage à eux) lors de mes retours épisodiques au laboratoire : Julie, Antoine, Camille, Juliette.*

*Quand j'ai travaillé à l'institut du fer à moulin j'ai aussi pu recevoir le soutien et des échanges importants avec de nombreuses autres personnes, et je ne peux tous les citer mais je retiendrai de façon générale ces soirées au Baratin ces manips du soir/nuit où toujours quelqu'un d'autre est présent (Je me dois au moins de citer Delphine, Mélanie (dit PATCH !) et Benoît (Comte de la perfection !), et le weekend (encore Mélanie ! Yuki, Vincenzo, Omar, Fanny, Georgia...). Et merci au soutien de l'équipe (ou plutôt des amis) : Nicolas, Angélique, Hanh, Marion, Rémi, Simona (à la compagnie et au courroux jamais inégalés), ce sacré Mathieu (la Vendée !) et Célia un soutien et un garde-manger infailible, avec qui j'ai échangé beaucoup sur la science et les diverses questions que je me suis posé.*

*Je tiens à remercier mes amis de faculté, Thibaud, Thibault, Axel, Manon et Kenzo, avec qui discuter de science a toujours été stimulant. Notre passion pour la science m'a toujours permis de voir l'envie et la beauté de la biologie...en plus de soirées inoubliables.*

*Merci à Kenzo, Maxence et Laura pour les mises au point de nos thèses autour d'un verre tout au long des 4 années.*

*Depuis ma licence, je me suis lié d'amitié dans la cité universitaire et à l'université avec des étudiants de tous horizons, France, Angleterre, Italie, Espagne, Finlande, Lituanie, Pologne, Roumanie, Russie, Turquie, Maroc, Algérie, Tunisie, Sénégal, Mali, Cameroun, Syrie, Liban, Israël, Palestine, Kazakhstan, Ouzbékistan, Viêtnam, Chine, Corée du sud, Japon, Indonésie, Australie, Etats-Unis, Canada, Mexique... Je ne peux pas citer chacun de leur nom, mais s'ils lisent cela ils se reconnaîtront. Je souhaite les remercier car ils ont nourri mon expérience universitaire. Cette découverte de différentes cultures participe à s'ouvrir et découvrir de multiples façons de manger (que de plats délicieux), de parler, se divertir (séance de cinéma italien, mahjong, Hanami, boire à la manière russe...), mais aussi de penser et réfléchir différemment. Un tour du monde à la fac !*

*Mes amis de Vendée, avec qui la thèse se mettait en parenthèse l'espace d'un instant pour revenir à profiter des petits moments de la vie, de la Vendée et repartir batterie chargée ! Merci plus particulièrement à Hugo L, Rodolphe, Sandra, Josépha, Doriane, Tanguy, Caroline, Louise, Faustine, Raphaël, Joffrey et Hugo F., François, Clément qui ont un temps partagé ma vie parisienne ou partagé mon grand appartement de 15m2 !*

*Merci au Dr.Adnet, qui a vu mon évolution depuis mes premiers pas en sciences, m'a fait partager sa vocation et sa passion, m'a conseillé et a toujours été à l'écoute au cours des années.*

*Merci à Hanyue, qui a pris la thèse en cours de route et qui a été une source de dopamine et de soutien et qui a su accepter et s'adapter à mes horaires tout au long de ce chemin tortueux qu'est la thèse.*

*Je tiens surtout à remercier ma famille. Mes parents, qui ont donné tout ce qu'ils pouvaient pour m'accompagner dans mes choix et ne me les ont jamais reprochés, que ce soient des réussites ou des échecs. De plus ils ont été là durant ces 4 années (et il faut être honnête même bien avant), à me soutenir, m'encourager et aussi supporter ma mauvaise humeur pendant mes périodes de stress. Ce soutien et ce libre choix tout le monde ne l'a pas, donc je veux leur dire merci. Merci aussi à ma sœur et à mon frère qui, bien qu'ayant pris des chemins bien différents, sont là pour moi et nos moments de partage sont toujours un bonheur. Ils sont un soutien que je sais disponible, quel que soit le futur.*

## Table des matières

Résumé.....	1
Remerciements .....	4
Table des matières .....	6
Index des Figures.....	8
Index des tableaux.....	9
Abréviations .....	10
Avant-propos.....	11
I. Introduction.....	13
A. Le système moteur.....	13
1. Son rôle fondamental dans le mouvement.....	13
2. Organisation du système moteur somatique.....	15
3. Diversité motoneuronale .....	19
B. Formation de la diversité motoneuronale .....	28
1. Contexte général : Les gènes architectes HOX.....	28
2. L'expression des Hox chez les vertébrés .....	29
3. Spécification des sous-types de MNs par les gènes <i>Hox</i> .....	35
C. Mise en place de la diversité des motoneurons spinaux lors de la formation de la moelle épinière.....	40
1. Elongation axiale lors de l'embryogenèse : signaux, types cellulaires et différenciation neurale.....	40
2. L'induction temporelle des gènes <i>Hox</i> préfigure leur domaine d'expression dans la moelle épinière.....	49
3. Progéniteurs neuromesodermaux : formation de la moelle épinière et induction des gènes HOX .....	53
4. Formation de l'axe dorso-ventral du tube neural : induction des domaines de progéniteurs neuraux.....	60
5. La formation des MNs chez l'Homme .....	67
D. Les CSPh : un outil d'étude du développement .....	69
1. Les cellules souches pluripotentes .....	69
2. Génération de motoneurons <i>in vitro</i> à partir de cellules souches pluripotentes .....	75
II. Objectifs.....	84
III. Résultats .....	86
IV. Discussion .....	132
A. Identification du code HOX dans les MNs spinaux le long de l'axe rostro-caudal chez l'Homme. ....	132

B.	Mécanismes des changements temporels de compétence des progéniteurs axiaux .....	133
1.	Génération de progéniteurs axiaux à partir de cellules souches pluripotentes humaines.	133
2.	Le changement de compétence des progéniteurs axiaux advient indépendamment de sources extrinsèques de FGF.....	134
3.	Des facteurs sécrétés intrinsèques aux progéniteurs régulent leurs changements de compétence.....	135
C.	Mode d'Intégration des signaux extrinsèques par les progéniteurs pour générer la diversité rostro-caudale. ....	137
1.	Notion d'intégration d'un facteur selon sa concentration Vs son temps .....	137
2.	Notion de temporalité : régulation de l'identité rostro-caudale au cours du temps .....	138
D.	Les motoneurones différenciés <i>in vitro</i> comme outils d'étude du développement et des maladies .....	139
1.	Etudes développementales .....	139
2.	Etudes dans un cadre pathologiques/thérapeutiques .....	142
	BIBLIOGRAPHIE.....	144

## Index des Figures

Figure 1 : Schéma simplifié de l'interaction entre MNs supérieurs et inférieurs dans le système moteur.....	13
Figure 2 : Organisation du système nerveux moteur somatique et autonome.....	14
Figure 3 : Représentation schématique d'un circuit sensori-moteur monosynaptique et polysynaptique.....	17
Figure 4 : La projection axonale des neurones sensoriels vers les chemins épiauxial et hypaxial dépend de la correcte projection des axones moteurs.....	18
Figure 5 : Organisation des motoneurones en colonnes sur une coupe coronale de moelle épinière.....	19
Figure 6 : Organisation des motoneurones spinaux en colonne.....	21
Figure 7 : Organisation des clusters <i>Hox</i> et leur expression le long de l'axe rostro-caudal.....	30
Figure 8 : Formule vertébrale chez la souris et l'Homme.....	31
Figure 9 : Domaine d'expression des différents <i>Hox</i> (3-13) le long des différents domaines brachiaux, thoraciques, lombaires de la moelle épinière chez le poulet au stade 30HH (6 jours post fécondation). .....	34
Figure 10 : Effet des pertes de fonctions des gènes <i>HOXs</i> sur la formation des populations de MNs.....	37
Figure 11 : Induction neurale dans les embryons de souris au jour 6.0 à 8.5 du développement.....	41
Figure 12 : Etapes de l'induction neurale et la spécification en domaine chez l'embryon de poulet.....	42
Figure 13 : Domaine d'expression des molécules Wnt et FGF et des facteurs de transcription impliqués dans la formation du tronc par élongation.....	47
Figure 14 : Schéma model de l'arrêt de l'élongation de la partie caudale du corps par GDF11.....	48
Figure 15 : Activation des gènes <i>Hox</i> dans le bourgeon caudal selon une colinéarité temporelle.....	49
Figure 16 : Domaine d'expression des gènes <i>Hox</i> le long de la partie caudale du corps en formation.....	50
Figure 17 : Formation progressive de la moelle épinière par élongation à partir de progéniteurs mésodermiques et neuraux.....	54
Figure 18 : Organisation de la région caudale de l'embryon et des différents types de progéniteurs de la ligne primitive selon leur position.....	56
Figure 19 : Représentation de l'évolution du profil <i>Hox</i> dans les progéniteurs neuromésodermaux au cours du développement de la souris.....	57
Figure 20 : Régulation du destin neuromésodermal au cours de l'élongation de la moelle épinière.....	59
Figure 21 : Implication de la voie Notch vers le destin neuronal.....	60
Figure 22 : Formation des différents domaines dorso-ventraux de la moelle épinière.....	61
Figure 23: Régionalisation dorso-ventrale des progéniteurs du tube neural selon le gradient d'activité de Sonic hedgehog.....	62
Figure 24 : Voies de signalisation induites par Shh dans la régionalisation dorso-ventrale du tube neural.....	63
Figure 25 : Effets du gradient d'activité de SHH sur la mise en place des différents domaines ventraux de la moelle épinière sur l'axe dorso ventrale.....	64
Figure 26 : Lancement de différenciation à partir des cellules souches pluripotentes <i>in vitro</i> .....	73
Figure 27 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans la spécification des CSP en cellules d'intérêt.....	74
Figure 28 : Schématisation des étapes de développement des motoneurones mimées <i>in vitro</i> .....	77
Figure 29 : Etape de différenciation des MNs spinaux à partir de CSPh selon le protocole développé par Maury et al., 2015.....	83

## Index des tableaux

Tableau 1 : Liste de mutation de gène codant pour des composants de voie de signalisation qui induisent la formation tronquée de la partie caudale de l'embryon de souris .....	44
Tableau 2 : Résumé de protocoles de différenciation de motoneurones à partir de cellules souches pluripotentes induites .....	76

## Abréviations

**AR** : Acide rétinoïque

**ARNm** : Acide ribonucléique messager

**BMP** : Bone morphogenetic protein (Protéine morphogénétique osseuse)

**Bra** : Brachyury

**CDX** : Homéoboîte de type caudal

**CE** : Corp embryoïde

**CEA** : Commissariat à l'énergie atomique

**CMH** : Colonne motrice hypaxiale

**CNH** : Frontière chordo-neurale (Chordo neural hinge)

**CSA** : Colonne spinale accessoire

**CSE** : Cellules souches embryonnaires

**CSP** : Cellules souches pluripotentes

**CMH** : Colonne motrice hypaxiale

**CMM** : Colonne motrice médiane

**CML** : Colonne motrice latérale

**CMP** : Colonne motrice phrénique

**CPG** : Colonne préganglionnaire

**Cyp26a1** : Cytochrome P450 Family 26 Subfamily A Member 1

**D-V** : Dorso-ventral

**ECL** : Epiblaste caudal latéral

**FGF** : Fibroblast growth factor (Facteurs de croissance Fibroblastique)

**FF** : Fibre rapide et fatigable

**FNT** : Facteurs neurotrophiques

**FOXP1** : Forkhead box protein P1

**FR** : Fibre rapide et endurante

**GDF11** : Growth factor 11 (Facteur de croissance de différenciation 11)

**GRD** : Ganglion de la racine dorsale

**HD** : Homéodomaine

**HH** : Hamilton et Hamburger

**HIS** : Hybridation *in situ*

**HOX** : Boîte à homéodomaine

**miARN** : Micro ARN

**MN** : Motoneurone

**MPS** : Mésoderme pré-somitique

**NC** : Notochorde

**NSB** : Frontière noeud/ligne (neural streak border)

**Ptch2** : Patched2

**PFA** : Paraformaldéhyde

**PMLP** : Progéniteur mésodermique paraxial/latéral

**pMN** : Zone progénitrice des MNs

**PNM** : Progéniteurs neuromésodermaux

**RALDH2**) : Retinaldéhyde déshydrogénase 2

**R** : Rhombomère

**RALDH2** : Retinaldehyde dehydrogenase 2

**R-C** : Rostro-caudal

**S** : Fibre lente et endurante

**SHH** : Sonic Hedgehog

**SLA** : Sclérose latérale amyotrophique

**SMA** : Amyotrophie spinale infantile

**SMN** : Survival MN gene

**SNC** : Système nerveux central

**SNP** : Système nerveux périphérique

**TALE** : Extension de boucle à trois acides aminés

**TBM** : Mésoderme du bourgeon caudal

**TPN** : Tube préneural

**VMCP** : Vague de mort cellulaire programmée

**WNT** : Wingless type

**ZM** : Zone du manteau

## Avant-propos

Le système nerveux est composé de plusieurs milliers de types de neurones. La génération de populations moléculairement et fonctionnellement distinctes est à la base de la formation des circuits neuronaux contrôlant l'ensemble de nos comportements. Le lien entre la diversité des identités neuronales et le fonctionnement du système nerveux s'illustre en contexte pathologique. Chaque maladie neurologique est caractérisée par des symptômes spécifiques causés par le dysfonctionnement ou la dégénérescence de populations neuronales particulières tandis que des populations proches sont préservées. Paradoxalement un grand nombre de ces maladies sont provoquées par des mutations dans des gènes exprimés de façon ubiquitaire. Il est donc essentiel de comprendre comment les identités neuronales sont établies et comment des mutations génétiques ou des facteurs environnementaux peuvent aboutir à des dysfonctionnements sélectifs qui caractérisent chaque pathologie. Les réseaux neuronaux moteurs de la moelle épinière et du tronc cérébral constituent un excellent système pour aborder ces questions.

Au cours du développement, en accord avec la diversité musculaire apparente du corps des vertébrés, des centaines de sous-types de motoneurones (MNs) sont générés le long de l'axe rostro-caudal (R-C) du tronc cérébral et la moelle épinière. Ces MNs acquièrent, en fonction de leur localisation le long de cet axe, des propriétés distinctes comme la position de leurs corps cellulaires, la spécificité de leurs projections axonales vers leur muscle cible ou encore leurs propriétés électrophysiologiques. Bien que l'utilisation de modèles animaux ait permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place de cette diversité neuronale, peu de choses sont connues en ce qui concerne son développement chez l'humain. Depuis plus de 20 ans, les cellules souches pluripotentes humaines, d'origine embryonnaire ou plus récemment les cellules souches induites à la pluripotence, représentent un outil précieux pour appréhender ces questions.

Mon travail de doctorat a été réalisé en co-tutelle au sein 1) de l'équipe du Dr. Cécile Martinat dont les recherches portent sur l'étude de maladies affectant la fonctionnalité des motoneurones. 2) de l'équipe du Dr. Stéphane Nedelec qui s'intéresse aux mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de la diversité neuronale en condition normale ou pathologique. Peu avant le début de ma thèse, le travail commun des Dr. Martinat et Nedelec avait, en autres, permis d'identifier les conditions de culture nécessaires à la conversion efficace et rapide des cellules souches pluripotentes humaines en motoneurones spinaux (Maury et al., 2015) ouvrant alors la possibilité à une étude des mécanismes moléculaires contrôlant la formation de la diversité motoneuronale humaine. Basé sur ce travail, l'objectif de mon travail de thèse consistait à utiliser le potentiel des cellules souches pluripotentes humaines pour développer de nouveaux modèles *in vitro* permettant d'appréhender les bases cellulaires et moléculaires du développement de la moelle épinière humaine et en particulier la

formation de la diversité motoneuronale. Ce travail fondamental devant ainsi permettre l'obtention *in vitro* de différentes populations de motoneurones afin d'aborder les bases de leur sensibilité préférentielle dans de nombreuses maladies incurables.

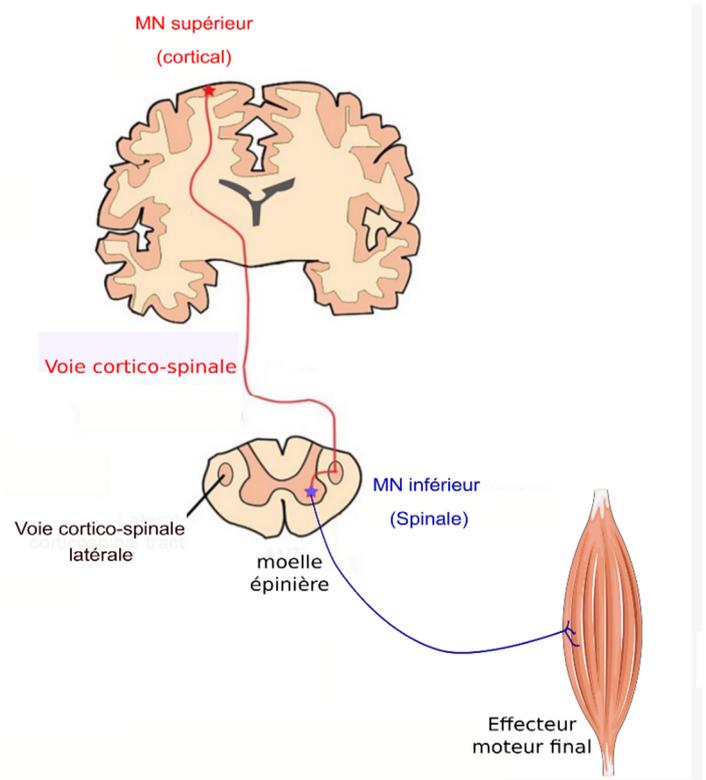
## I. Introduction

Au cours du développement embryonnaire, la mise en place de réseaux neuronaux qui soutiennent le pouvoir computationnel du système nerveux, dépend de la spécification de plusieurs milliers de types neuronaux moléculairement et fonctionnellement distincts. Un des systèmes qui illustre le mieux cette relation entre formation d'une grande diversité neuronale et l'établissement de circuits neuronaux distincts est le système moteur qui assure l'ensemble des fonctions exécutives du système nerveux et des interactions avec l'environnement.

### A. Le système moteur

#### 1. Son rôle fondamental dans le mouvement

Le système moteur correspond à l'ensemble des neurones impliqués dans les comportements moteurs basiques que sont la marche, la respiration, la digestion et l'activité sécrétrice de glandes. Le contrôle de l'activité musculaire et glandulaire permet à l'organisme d'agir en réponse aux événements de son environnement et de réguler son milieu intérieur. Le système moteur se divise entre 1) le système nerveux central (SNC) composé des motoneurones (MNs) corticaux dont les somas sont localisés dans le cortex, des MNs crâniens localisés dans le tronc cérébral et le mésencéphale, des MNs spinaux dont les corps cellulaires sont localisés dans la moelle épinière et 2) Le système nerveux périphérique (SNP) qui comprend l'ensemble des neurones formant les nerfs et les ganglions interagissant entre le SNC et les organes cibles. On distingue alors deux voies motrices : somatique et autonome.



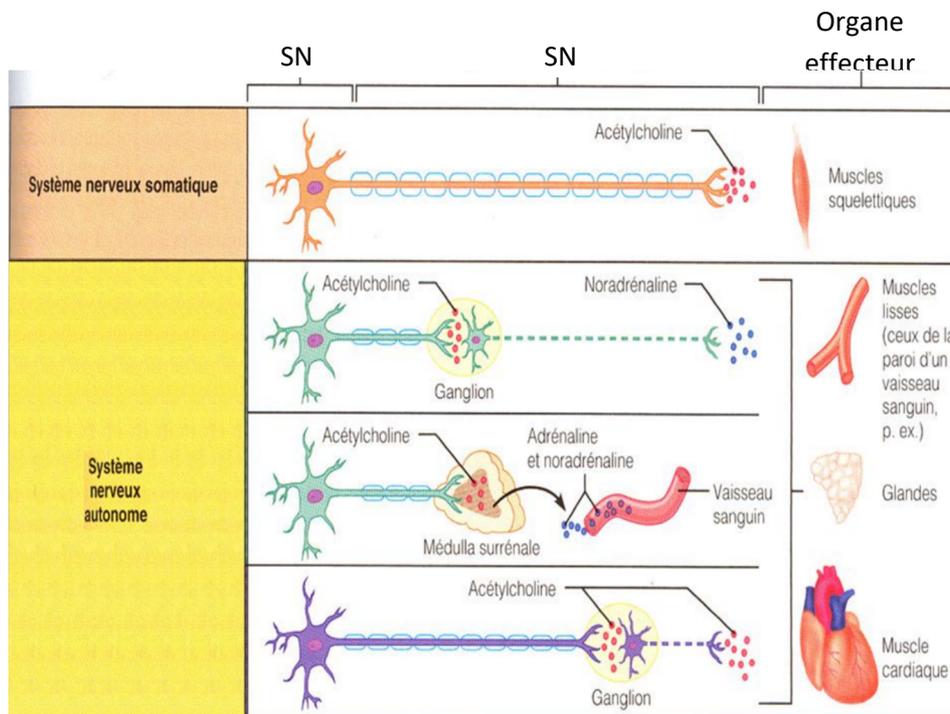
**Figure 1 : Schéma simplifié de l'interaction entre MNs supérieurs et inférieurs dans le système moteur.**

L'initiation du mouvement est induit par les MNs supérieurs localisés dans l'aire du cortex moteur et qui projettent vers les MNs spinaux via la voie cortico-spinale. Au niveau du bulbe rachidien, la majorité des axones se projettent de façon contralatérale le long de la moelle épinière via le tracus cortico-spinale latéral et vont innerver leur MN cible. (Modifié d'après Ragagnin et al., 2019)

1) Le système moteur somatique :

Il contrôle l'activité des muscles squelettiques. Le corps humain est composé d'environ 639 muscles dont plus de 300 paires de muscles distincts participant aux mouvements moteurs coordonnés (Stone and Stone, 2000). Cela représente plus de 100 millions de fibres musculaires. La contraction de ces différents muscles est contrôlée par de multiples populations distinctes de MNs dont l'activité est modulée par les neurones moteurs corticaux. Les MNs somatiques crâniens forment la composante motrice des noyaux oculomoteurs (nerf III), trochléaires (nerf IV) abducens (nerf VI) et hypoglossiques (Nerf XII). Tandis que les neurones branchiomoteurs présents dans les noyaux moteurs des nerfs trijumeau (V), facial (VII), glossopharyngien (IX), vague (X), et hypoglosse (XI), innervent les muscles dérivés des arcs branchiaux qui sont présents au niveau de la face (Figure 1) (Ragagnin et al., 2019).

2) Le système moteur autonome :



**Figure 2 : Organisation du système nerveux moteur somatique et autonome.**

Les corps cellulaires des MNs localisés dans le système nerveux central projettent leur axone en périphérie vers leur organes cibles. Les axones des MNs somatiques et branchiomoteurs forment une jonction neuro-musculaire avec les fibres des muscles squelettiques dans le système nerveux somatique alors que les MNs du système nerveux autonome régulent l'activité des muscles faciaux cardiaques/lisses indirectement via la formation d'une synapse avec les MNs localisés dans les ganglions sympathiques et parasympathiques. Le contrôle de l'activité des glandes exocrines et endocrines par les MNs se fait via une connexion directe. (Modifié d'après Nâdiya Roth)

SNC = système nerveux central, SNP = système nerveux périphérique

Ce système, appelé également système nerveux viscéral, correspond à la partie du système nerveux responsable des fonctions non soumises au contrôle volontaire. Il inclut des MNs du tronc cérébral et de la moelle épinière projetant vers les muscles lisses, les muscles cardiaques et les ganglions

sympathiques et parasympathiques (Figure 2). Lors de ma thèse je me suis focalisé sur l'étude des motoneurons du système moteur somatique.

## 2. Organisation du système moteur somatique

Le système moteur somatique est composé de l'ensemble des neurones sensoriels (afférents) et des neurones moteurs (efférents) participant respectivement à :

1) la transmission des stimuli sensoriels conscients et inconscients vers le système nerveux central (SNC)

2) la transmission des influx moteurs volontaires vers les muscles squelettiques pour générer un mouvement mécanique.

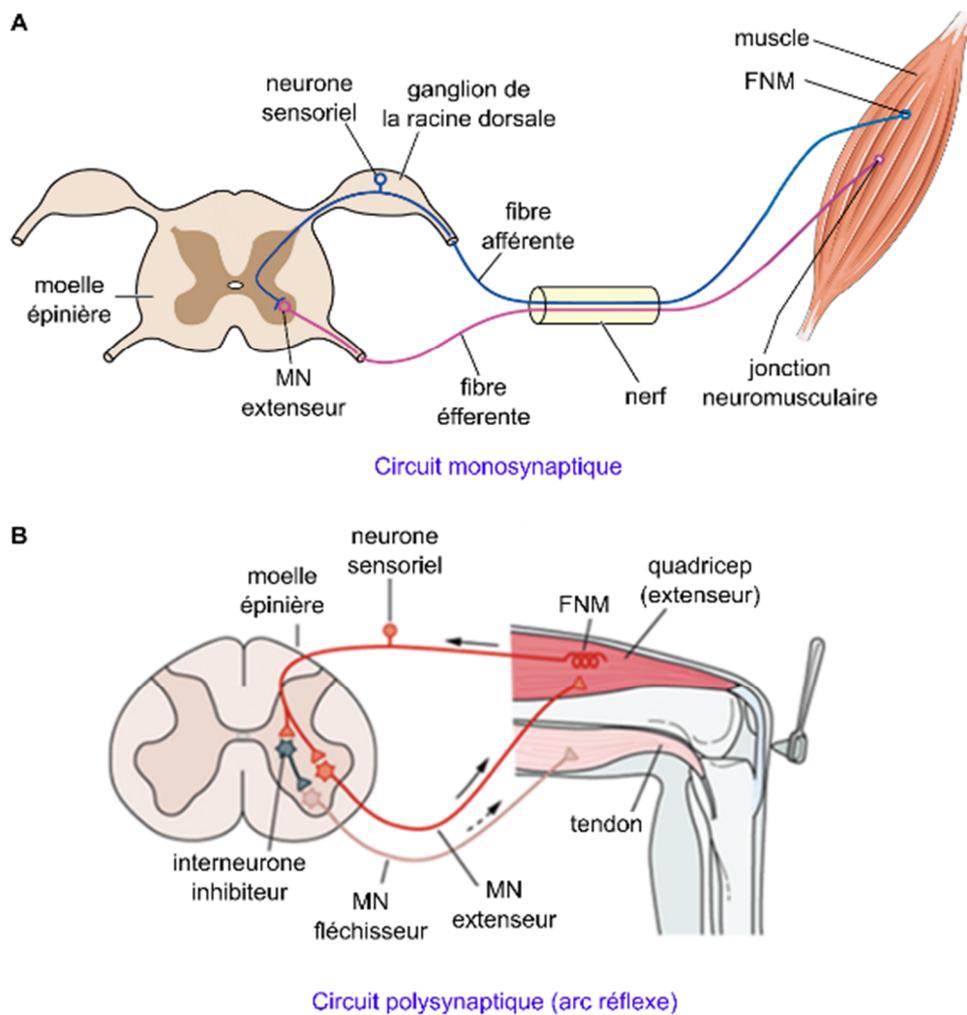
Le système moteur somatique se divise en 2 parties représentées par : 1) les nerfs crâniens émergeant de l'encéphale et du tronc cérébral, 2) les nerfs mixtes rachidiens (formés à partir de fibres sensibles et de fibres motrices) émergeant de la moelle épinière. La moelle épinière fait le pont entre le système nerveux central et le système nerveux périphérique en transmettant des actions motrices émises depuis le cerveau vers les muscles squelettiques et en intégrant des informations captées par les récepteurs proprioceptifs du système nerveux périphérique.

Plus particulièrement, de la moelle épinière humaine émergent 31 paires de nerfs rachidiens : 8 nerfs cervicaux, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacraux et 1 au niveau du coccyx. La moelle épinière se divise en 2 zones : la région périphérique composée des axones des neurones moteurs et sensoriels qui sont recouverts d'une gaine de myéline et forment la matière blanche, et la région centrale qui regroupe les corps cellulaires des neurones constituant la matière grise. La corne dorsale de la moelle épinière comprend les interneurons somatiques et viscéraux tandis que la corne ventrale comprend des interneurons moteurs et les corps cellulaires des neurones moteurs.

La connexion entre la moelle épinière et les nerfs rachidiens est l'étape du passage du système nerveux central vers le système nerveux périphérique. La périphérie de la moelle épinière est formée de deux racines à l'origine du nerf rachidien. Ces racines sont formées par les axones des neurones sensoriels en dorsal et des neurones moteurs en ventral. En effet, les corps cellulaires des neurones sensoriels, donnant les fibres afférentes, se trouvent dans les ganglions de la racine dorsale (GRD) (Chen et al., 2003; Knierim, 2018). A partir du ganglion, ils projettent d'un côté vers la corne dorsale en formant la racine dorsale pour ensuite former des connexions avec des interneurons ou encore les somas des MNs et d'un autre côté vers un muscle où ils détectent différents paramètres sensoriels selon leur identité (voir plus bas). De leur côté, les axones des MNs spinaux forment la racine ventrale. Vers la périphérie, les racines ventrales et dorsales se joignent pour former les nerfs.

Les circuits sensori-moteurs somatiques sont nécessaires aux mouvements coordonnés en permettant d'intégrer les stimuli proprioceptifs et de générer la contraction des muscles cibles tout en maintenant l'intégrité et l'équilibre du corps grâce au circuit réflexe (Dietz, 2002). L'unité basale des circuits sensori-moteurs somatiques est composée d'une fibre afférente sensitive (fibre Ia), un MN cholinergique qui forme une jonction neuromusculaire avec plusieurs fibres musculaires du muscle cible (Figure 3A) (Eccles et al., 1957). Lorsque l'influx nerveux arrive à la terminaison nerveuse des MNs, cela entraîne la libération d'acétylcholine qui se lie aux récepteurs cholinergiques post-synaptiques. L'activation de ces récepteurs entraîne une dépolarisation des fibres musculaires. Si la globalité des signaux post-synaptiques excitateurs reçus par une fibre musculaire dépasse le seuil critique de dépolarisation, les canaux sodiques voltage-dépendant de la membrane de la fibre musculaire s'ouvrent permettant l'entrée d'ion sodium dans la cellule et déclenchant un potentiel d'action musculaire qui induit la contraction de la fibre (Hughes et al., 2006).

La formation d'un circuit sensori-moteur basique se fait toujours entre un neurone sensitif et un neurone moteur innervant un même muscle cible (Figure 3A) (Mendell and Henneman, 1968). La connexion entre les neurones sensitifs et moteurs est hautement sélective pour prévenir la formation de circuits neuronaux avec des neurones innervant des muscles antagonistes ou sans lien fonctionnel (Frank and Mendelson, 1990). Se forment aussi des circuits sensori-moteurs plus complexes où par exemple les neurones sensitifs de type Ia et II innervent des interneurons de la moelle épinière afin d'inhiber indirectement les MNs projetant sur des muscles cibles antagonistes (Figure 3, B) (Dietz, 2002). L'étirement d'un premier muscle va activer les récepteurs propriocepteurs présents au niveau du fuseau neuromusculaire (le fuseau neuromusculaire correspond à un ensemble de fibre musculaire ayant un rôle sensitif et de proprioception du muscle renseignant le degré de son étirement) et le neurone sensitif connecté va activer un MN innervant le même muscle cible et va par l'intermédiaire d'un interneurone inhibiteur (de type Ia) de la moelle épinière inhiber l'activité du MN ciblant le muscle antagoniste. Ce circuit, dit polysynaptique, intervient dans le cadre de la coordination d'un mouvement impliquant deux muscles antagonistes tels que le réflexe myotatique, réflexe d'étirement qui permet à un muscle donné de s'opposer, en se contractant, à son propre étirement et donc de conserver un certain tonus. Le système réflexe inversé correspond à la fonction opposée, les récepteurs sensoriels localisés entre le tendon et le muscle (Organe tendineux de golgi (OTG)) mesurent le degré de la force de contraction du muscle. L'augmentation de la contraction musculaire entraîne l'activation des neurones sensoriels Ib. Les interneurons Ib de la moelle épinière sont activés par ces neurones sensitifs et inhibent l'activité des MNs innervant des muscles du même groupe.



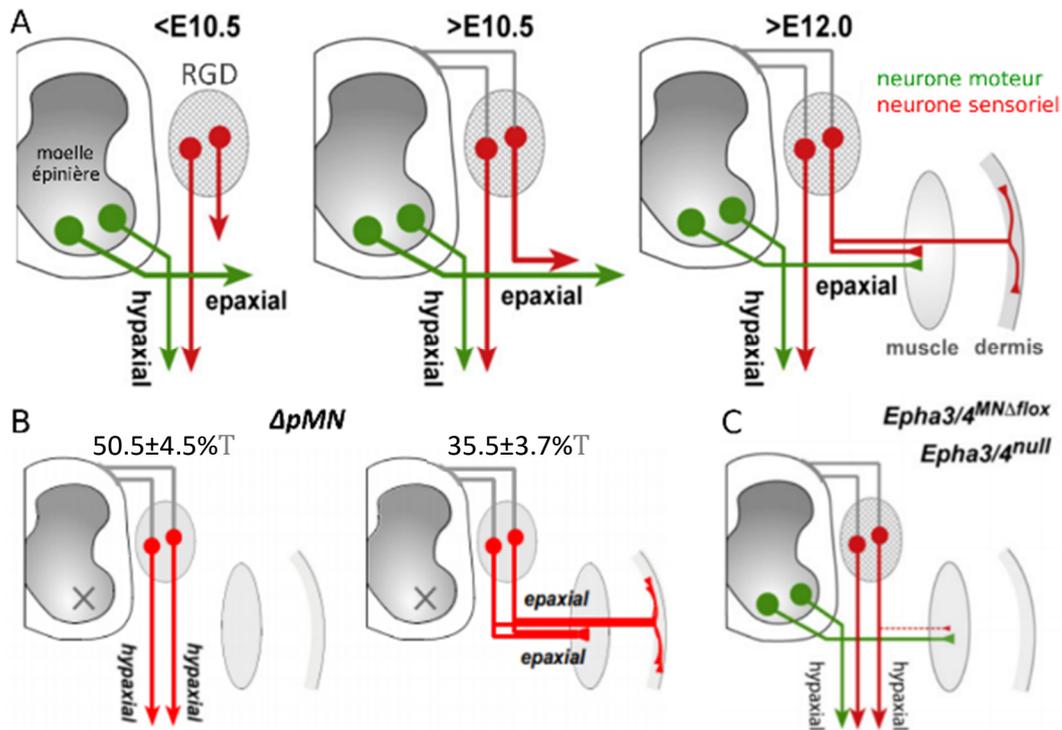
**Figure 3 : Représentation schématique d'un circuit sensori-moteur monosynaptique et polysynaptique.**

(A) Le circuit monosynaptique ne comporte qu'un neurone sensoriel, un MN et le muscle cible. L'intégration de signaux afférents via les récepteurs proprioceptifs transmis à la moelle épinière via les neurones sensoriels. Puis activation du motoneurone par le neurone sensoriel via leur synapse. Stimulation des fibres musculaires cible par le MN et contraction musculaire. (Modifié d'après le schema du *Scottish Acquired Brain Injury Network (SABIN)*) (B) Un des circuits polysynaptiques connu est l'arc réflexe. Lorsqu'un muscle est étiré, une impulsion est générée dans le fuseau musculaire et cette information est transmise par le neurone sensoriel de la moelle épinière. Le neurone sensoriel interagit directement avec le neurone moteur via une synapse et l'impulsion transmise entraîne une contraction musculaire. En parallèle, les muscles antagonistes doivent se détendre. Ce fléchissement du muscle antagoniste s'effectue par via l'activation par le neurone sensoriel d'un neurone intermédiaire inhibiteur dans la moelle épinière. Ce dernier alors permet de prévenir l'activation du MN innervant le muscle antagoniste. (Modifié d'après *Mosconi et Graham Neuroscience for rehabilitation 2017*)

FNM = fuseau neuromusculaire, MN = motoneurone.

Les motoneurones jouent un rôle central dans la mise en place de ces circuits. En effet, des expériences d'ablation chirurgicale de MNs à des stades précoces du développement embryonnaire chez le poulet ont permis de montrer la nécessité de la présence des MNs pour la formation des projections des axones des neurones sensoriels (Honig et al., 1986 ; Landmesser and Honig, 1986). Il a ensuite été démontré qu'altérer l'identité des MNs par perte ou gain de fonction de gènes gouvernant leur spécification ou les éliminer par chirurgie affecte la mise en place des circuits moteurs mais aussi sensoriels (Baek et al., 2017; Lance-Jones and Landmesser, 1980; Landmesser, 2001; Wang et al., 2011). A titre d'exemple, l'absence de récepteurs Ephrine A3/4 au niveau des axones des MNs ou

l'absence de projections axonales de MNs aboutissent à une perturbation de la projection des neurones sensoriels (Figure 4) (Wang et al., 2011).



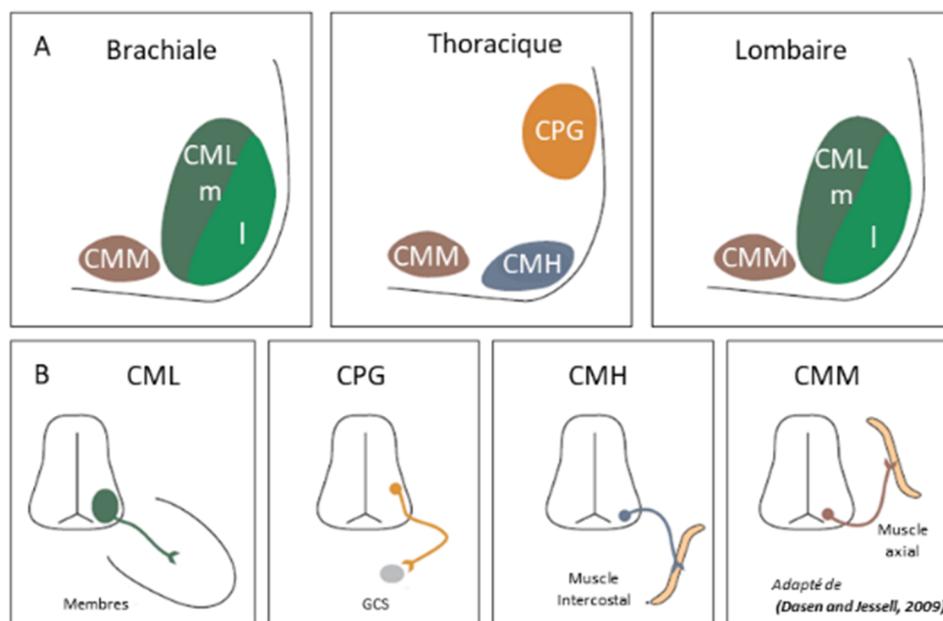
**Figure 4 : La projection axonale des neurones sensoriels vers les chemins épiauxial et hypaxial dépend de la correcte projection des axones moteurs.**

A) Projection des axones moteurs et sensoriels vers les domaines hypaxiaux et épiauxiaux lors du développement murin entre le jour 10.5 et 12.5 du développement. La projection des neurones sensoriels épiauxiaux suit la projection pré-établie du MN épiauxial. B) Projection anormale des neurones sensoriels hypaxiaux et épiauxiaux dans un modèle murin ayant subi une l'ablation génétique des progéniteurs de MNs (pMN), la proportion des circuits formés a été quantifiée. C) En absence de récepteur éphrine 3 / 4 au niveau des axones moteurs, très peu de neurones sensoriels peuvent projeter vers la voie épiauxiale. (Modifié d'après Wang et al., 2011)

Si le circuit basique sensori-moteur se répète le long de l'ensemble de la moelle épinière, les fonctions motrices servies par les différents groupes musculaires le long de l'axe du corps sont extrêmement différentes. Ceci se reflète dans la diversité musculaire apparente du corps. A cette diversité musculaire correspond des centaines de sous-types différents de motoneurones (MNs) qui sont générés précocement au cours du développement embryonnaire le long de l'axe R-C de la moelle épinière. Cette diversité va assurer la mise en place des différents circuits moteurs permettant le contrôle des multiples muscles du corps.

### 3. Diversité motoneuronale

Bien que présent le long de l'ensemble de la moelle épinière et servant des fonctions similaires, la diversité motoneuronale se traduit en partie par l'organisation anatomique des différents types de MNs qui se distinguent par leur identité segmentaire, de colonne et de « pool ». Ainsi, au sein des segments brachiaux, thoraciques, lombaires et sacrés les corps cellulaires des MNs innervant les muscles dorsaux, ventraux des membres ou les neurones pré-ganglionnaires s'organisent en colonne motrices (Figure 5). Au sein de ces colonnes, les corps cellulaires des MNs innervant un muscle donné sont regroupés pour former un « pool » moteur.



**Figure 5 : Organisation des motoneurons en colonnes sur une coupe coronale de moelle épinière.**

(A) Répartition des MNs dans la moelle épinière selon leur identité en colonne aux niveaux des domaines brachiaux, thoraciques et lombaires. (B) Projections axonales des MNs vers leur tissu cible selon leur identité en colonnes. Les CML projettent dans le membre, les CPG innervent les ganglions du système sympathique, les CMH innervent les muscles intercostaux et les CMM innervent les muscles axiaux (en position dorsale). (Modifié d'après Dasen and Jessell, 2009)

CMM = Colonne motrice médiane, CMLm = Colonne motrice latérale médiane, CMLl = Colonne motrice latérale latérale, CMH = Colonne motrice hypaxiale, CPG = Colonne pré-ganglionnaire.

#### a) Les colonnes motrices

##### *i. La colonne motrice médiane*

Les MNs de la colonne motrice médiane (CMM) sont présents tout le long de l'axe R-C de la moelle épinière. Localisé dans la zone ventrale médiane, ils projettent leur axone hors du système nerveux central pour innervent les muscles dorsaux axiaux issus du dermomyotome (Gutman et al., 1993). Ces muscles participent largement au maintien de la stature du corps. Les MNs CMM sont

caractérisés par exemple par la coexpression des facteurs de transcription Lhx3, Evi1, Isl1 et ISL2. Si les MNs post-mitotiques tout juste générés expriment tous Lhx3, seuls les MNs CMM continuent de l'exprimer plus tard et peuvent être donc être identifiés ainsi par ce marqueur ainsi que par l'expression d'autres marqueurs spécifiques comme Evi1 ou ebf2 (Sharma et al., 1998; Tsuchida et al., 1994). Lhx3 joue un rôle essentiel dans la spécification des MNs CMM. Chez la souris, son expression forcée dans les progéniteurs de MNs et son maintien dans les neurones post-mitotiques est suffisante pour imposer une identité CMM aux MNs en développement (Sharma et al., 2000, 1998).

#### *ii. Colonne spinale accessoire*

Les MNs de la colonne spinale accessoire (CSA), localisée dans la partie cervicale de la moelle épinière (C1 à C5 du segment cervical), innervent les muscles du cou et le mastoïdien. Ils se différencient des autres MNs spinaux par l'innervation de muscles sterno-cleido-mastoidiens et trapèze (Aldskogius et al., 2009) et se caractérisent par l'expression de la protéine CD166, aussi appelée (ALCAM) (Dillon, 2005), et des facteurs de transcription Isl1, Runx1 et Phox2B (Kobayashi et al., 2013; Stifani and Ma, 2009).

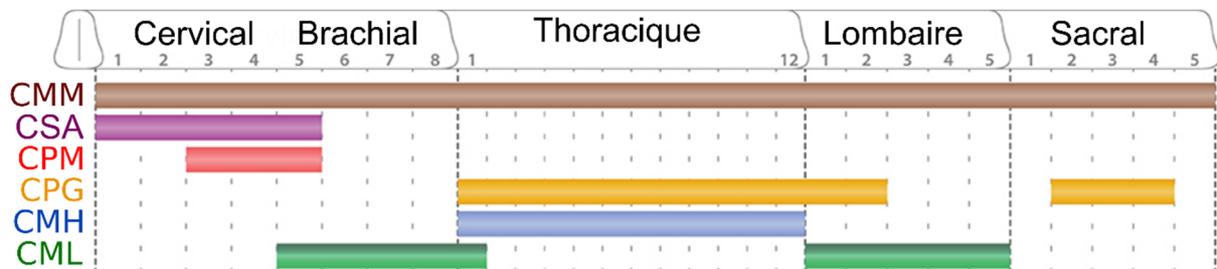
#### *iii. Colonne motrice phrénique*

Les MNs phréniques projettent leurs axones vers le diaphragme, muscle impliqué dans le contrôle de la respiration (Song et al., 2000). Cette colonne est dans la partie cervicale et s'étend de C3 à C5. Dans cette région, ces MNs se caractérisent par l'expression des facteurs de transcription Hb9, Scip, Isl1, Tshz1 et Alcam (Chaimowicz et al., 2019; Machado et al., 2014; Philippidou et al., 2012; Philippidou and Dasen, 2013).

#### *i. Colonne motrice préganglionnaire*

Contrairement aux autres MNs spinaux, les MNs de la colonne préganglionnaire (CPG) ne ciblent pas les muscles squelettiques mais les neurones ganglionnaires de la chaîne sympathique. Les corps cellulaires de ces MNs sont localisés au niveau de deux zones : la zone intermedio-latérale et la zone sacrale de la moelle épinière. Dans la première zone, la colonne s'étend entre la partie T1 du segment thoracique et la partie L1 du segment Lombaire, et la deuxième zone est située entre le segment S2 et S4 (Figure 6) (Mitchelle and Watson, 2016; Stifani, 2014). Ces sous-types de MNs expriment Isl1, nNos, pSmad 1/5/9, Zeb2 et faiblement la protéine Forkhead box1 (Foxp1). Des études de gain et perte de fonction de Isl1/2 démontrent que le maintien de l'expression Isl1 et la répression de Isl2 dans les MN post-mitotiques jeunes suffit à définir une spécification des MN en colonne CPG (Thaler et al., 2004). La partie des MNs du segment sacral formant une colonne CPG (partie S2 à S4) innervent des neurones ganglionnaires qui ont été associés depuis plus d'un siècle au système

parasympathique mais qui ont récemment été démontrés comme appartenant au système sympathique (Espinosa-Medina et al., 2018, 2016).



**Figure 6 : Organisation des motoneurones spinaux en colonne.**

Les différentes colonnes de MNs spinaux sont réparties le long de la moelle épinière. Seuls les MNs projetant vers les muscles axiaux (CMM) sont présents en continu le long de l'axe R-C de la moelle épinière. Les MNs innervant les muscles des membres (CML) sont localisés dans la partie caudale cervicale (aussi dénommé brachiale), les MNs ciblant les membres supérieurs sont localisés au niveau lombaire.

(Modifié d'après Stifani 2014)

CMM = colonne motrice médiane, CSA = colonne spinale accessoire, CPM = colonne motrice phrénique, CPG = colonne préganglionnaire, CMH = colonne motrice hypaxiale, CML = colonne motrice latérale.

#### iv. Colonne motrice hypaxiale

Les MNs innervant les muscles intercostaux et abdominaux se regroupent dans une même colonne dont il a longtemps été proposé qu'elle se trouvait localisée exclusivement dans le segment thoracique de la moelle épinière (Gutman et al., 1993; Sharma et al., 2000; Smith and Hollyday, 1983). Anciennement associés aux MNs CMM, ils étaient considérés comme une sous-division spécifique du segment thoracique innervant les muscles axiaux ventraux (Jessell, 2000) et des travaux récents ont mis en évidence que cette colonne pourrait en fait être présente le long de l'ensemble de la moelle épinière (Rousso et al., 2008). Ils se caractérisent par l'expression des marqueurs Isl1, Er81 et faiblement Isl2 et Scip (Dasen et al., 2008; Rousso et al., 2008).

#### v. Colonne motrice latérale

Les muscles des membres sont innervés par les MNs formant la colonne motrice latérale (Bueker, 1944). Ces MNs sont localisés dans la zone latérale-ventrale de la moelle épinière et répartis sur l'axe R-C dans les domaines C5 à T1 pour le domaine brachial/thoracique innervant les membres antérieurs et L1 à L5 pour le domaine lombaire (membres inférieurs) (Hollyday and Jacobson, 1990). Bien que ces neurones se subdivisent en deux colonnes, ils sont caractérisés par l'expression commune d'Isl2, de Foxp1 et de la Retinaldehyde dehydrogenase 2 (Raldh2) et de la perte d'expression Lhx3 (Dasen et al., 2008). Des études réalisées sur le poulet ont démontré le rôle nécessaire de l'Acide rétinoïque (AR) sécrété par le mésoderme paraxial pour la spécification de ces MNs. La colonne LMC

est sous divisée en deux colonnes selon l'axe latéro-médian de la moelle, ciblant des groupes de muscles différents :

La CMLm, la plus médiane des deux colonnes, innerve les muscles de la partie ventrale des membres principalement composée de muscles fléchisseurs alors que la CMLl (latérale), localisée dans la zone la plus latérale de la colonne, innervent les muscles principalement extenseurs de la partie dorsale des membres (Tosney and Landmesser, 1985a, 1985b). Les MNs CMLm se caractérisent par l'expression de Isl1 et Isl2 et l'absence de Hb9 tandis que les CMLl sont caractérisés par l'expression de Lhx1 et de Hb9 et l'absence de Isl1.

#### b) [Organisation des MNs en pools](#)

Dans les différentes colonnes, les corps cellulaires des MNs innervant un muscle donné sont regroupés en un pool moteur. Ces pools ont été initialement mis en évidence par des expériences de traçage rétrograde par injection de la Horse radish peroxidase dans des muscles (Hollyday, 1980; Landmesser, 1978a, 1978b; Romanes, 1964) qui ont révélé une organisation topographique des différents pools. Au niveau de la CML innervant les membres inférieurs et postérieurs, les pools les plus antérieurs ciblent les muscles les plus proximaux des membres, tandis que les pools les plus caudaux innervent les muscles les plus distaux (Hollyday and Jacobson, 1990; Mendelsohn et al., 2017). L'ensemble des pools moteurs qui innervent les muscles exerçant des fonctions synergiques au niveau d'une articulation particulière sont eux-mêmes regroupés en mini-colonnes qui couvrent le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière lombaire (Romanes, 1964). Les analyses moléculaires ont permis de mettre en évidence des marqueurs spécifiques de certains pools de MNs. Par exemple, les MNs CMLl, innervant chez la souris le muscle deltoïde, expriment fortement Isl2 et Lhx1, tandis que ceux innervant le muscle long extenseur radial du carpe expriment Lhx1 mais faiblement Isl2 (Ensini et al., 1998). Les facteurs de transcription Pea3, Er81, Scip (Dasen et al., 2005; Livet et al., 2002; Mendelsohn et al., 2017) sont aussi exprimés sélectivement par certains pools de MNs. La projection des axones des MNs provenant d'un pool donné vers leur muscle cible se fait directement avec une grande précision et ne passe pas par une étape de raffinement de projections ayant contactés des muscles ectopiques. En effet, chez le poulet quand des pools de MNs sont déplacés par greffe ils innervent tout de même la bonne cible (Landmesser, 2001). De même, la modification de la position des muscles cibles ne change pas l'identité des pools mais entraîne une modification de la trajectoire de leurs axones pour innerver leur cible musculaire (Landmesser, 2001). La précision de cette innervation provient de l'expression de combinaisons de molécules de guidage axonal par les différents pools de MNs qui guident leurs axones vers leurs cibles particulières (Dalla Torre di

Sanguinetto et al., 2008) et spécifiques (Cohen et al., 2005; De Marco Garcia and Jessell, 2008; Rekling et al., 2000).

La relation topographique entre position des pools et muscles cibles souligne l'importance de la position des MNs dans la mise en place des circuits moteurs. Il est admis qu'au cours de la formation des MNs, ces derniers acquièrent leur identité en 2 phases : une détermination par des facteurs principalement intrinsèques puis une détermination par des signaux extrinsèques provenant de la périphérie et en particulier des muscles cibles (Dasen and Jessell, 2009; Mendelsohn et al., 2017). Les MNs caractérisés par l'expression des facteurs de transcription ETS, Pea3 et Er81 innervant les muscles des membres est un des exemples de la spécification de pools MNs par des signaux extrinsèques. Dans le cas du pool de MNs exprimant Pea3 la connexion de ces MNs à leur cible les expose au facteur GDNF exprimé par leur muscle cible. Cette exposition au GDNF entraîne l'expression de Pea3 par ces MNs gouvernant alors leur regroupement dans la moelle, la formation de leur arbre dendritique et leur projection axonale dans le muscle cible (Haase et al., 2002; Livet et al., 2002). L'expression de Er81 dans ces MNs est elle aussi dépendante des tissus périphériques puisqu'une lésion des axones moteurs entraîne une perte de Er81 (Lin et al., 1998). Par contre, le signal induisant cette expression n'est pas connu.

#### c) [Sous-divisions des MNs au sein d'un pool](#)

Au-delà de l'identité des MNs en pool, les MNs innervant des types de fibres musculaires distinctes possèdent des caractéristiques différentes. Les MNs se subdivisent en trois groupes majeurs,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les MNs  $\alpha$  innervent les fibres musculaires externes au fuseau neuromusculaire, dites extrafusales, impliquées dans la contraction des muscles et la génération du mouvement. Les MNs  $\gamma$  innervent les fibres du fuseau neuromusculaire dites intrafusales. Ils sont impliqués dans le maintien d'une tension dans les fuseaux musculaires en réponse à un étirement. Les MNs  $\beta$  innervent les deux types de fibres. Les MNs  $\alpha$  et  $\gamma$  se distinguent par leurs propriétés anatomiques et moléculaires. Les MNs  $\alpha$  possèdent un corps cellulaire et une arborisation axonale plus importantes que celles des MNs  $\gamma$  (Burke et al., 1973). L'arborisation dendritique est de même longueur entre les MNs mais est plus simple pour les MN  $\gamma$  (Westbury, 1982). L'activité de la plupart des MNs  $\alpha$  est régulée directement par des neurones senseurs proprioceptifs tandis que les MNs  $\gamma$  reçoivent les informations sensorielles via des interneurons (Westbury, 1982). Il est supposé que ces différences de propriétés s'acquièrent par des programmes transcriptionnels distincts. Cependant ces mécanismes sont mal connus et à l'heure actuelle, les différences moléculaires entre les MNs  $\alpha$  et  $\gamma$  se font principalement au stade postnatal.

Au cours du développement, tous les MNs naissants expriment le récepteur nucléaire hormonal orphelin 3 (Err3), son expression se restreint aux MNs  $\gamma$  lors des deux premières semaines post-natales (Friese et al., 2009). Les MNs  $\gamma$  au stade post-natal sont aussi identifiables par une série de marqueurs, comprenant par exemple Gfr $\alpha$ 1 (Shneider et al., 2009). Les différences moléculaires entre MNs  $\alpha$  et  $\gamma$  et  $\beta$  au cours de l'embryogenèse si elles existent restent méconnues. Récemment, Wnt7a (Wingless Type 7a) a été identifié comme étant spécifiquement exprimé par les MNs  $\gamma$  à E17,5 (Jour 17,5 de fécondation) chez la souris ouvrant la voie à la découverte de marqueurs plus précoces. On peut espérer que la technologie de séquençage de cellules uniques permettra de révéler ces différences.

En résumé, ces études démontrent que lors du développement du système sensorimoteur, les MNs envoient leurs axones vers la périphérie pour former des connexions avec des muscles spécifiques et ainsi contrôler la locomotion. Selon leur position rostro-caudale, les sous-types MNs acquièrent des propriétés distinctes qui dictent la position de leur corps cellulaire, la détermination du trajet axonal, la spécificité de la cible musculaire et leur fonction (Jessell, 2000).

Tous les axones des MNs sortent de la moelle épinière par les racines ventrales. Ensuite, ils divergent vers la musculature axiale, les membres ou les ganglions sympathiques. Ces trajectoires axonales correspondent à la formation des colonnes motrices par les corps cellulaires des MNs. Au niveau des membres, les MNs de la colonne motrice médiane (MMC) envoient leurs axones dorsalement pour innervier le dermomyotome tandis que les MNs de la colonne motrice latérale (LMC) innervent les membres (Figure 5). Une fois ces divisions majeures mises en place, une cible musculaire unique est sélectionnée. Puis, du côté musculaire, les axones des neurones moteurs élaborent un arbre axonal complexe qui envahit leur cible musculaire tandis que dans la moelle épinière, les corps cellulaires des MNs innervant un muscle donné coalescent dans une position stéréotypée pour former un pool moteur (Jessell, 2000). Au sein de ces pools les MNs acquièrent des propriétés moléculaires et physiologiques distinctes en accord avec les types de fibres musculaires qu'ils innervent.

#### d) [La diversité des motoneurones spinaux chez l'Homme](#)

L'accès restreint aux tissus humains est à l'origine des connaissances limitées de l'organisation des motoneurones et de leur hétérogénéité moléculaire chez l'Homme. Des études histologiques ont montré que les MNs sont aussi organisés en colonnes de manière similaire à ce qui est observé chez la souris (Altman and Bayer, 2001). De même, certaines études, utilisant des méthodes d'hybridation *in situ* (HIS) et d'immunomarquage, réalisées sur des embryons humains ont permis de déterminer que l'expression différentielle de certains facteurs de transcription est conservée (Altman and Bayer, 2001;

Amoroso et al., 2013; Marklund et al., 2014). Ainsi les MNs de la colonne CMM expriment LHX3+ tandis que ceux de la colonne CML expriment FOXP1. Au sein de cette colonne, les CMLI expriment LHX1, mais pas ISL1 tandis que HB9 est maintenu dans les CMLm (Amoroso et al., 2013). ER81 a aussi été étudié chez l'Homme. Son expression dans un pool de MNs CML est conservée à 14 semaines post-fécondation, suggérant que comme chez la souris, ER81 pourrait jouer un rôle dans la formation des pools de MNs (Clowry et al., 2005). Son expression dans la colonne CMH n'a en revanche pas été rapportée, suggérant de possibles différences entre l'Homme et la souris ou la détection seulement dans les cellules l'exprimant le plus fortement.

#### e) Diversité motoneuronale et pathologies des motoneurones

De nombreuses pathologies affectent le système moteur, dont certaines touchent plus particulièrement les MNs. Les maladies affectant les MNs constituent collectivement le troisième groupe de maladies neurodégénératives après la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Elles restent, pour la plupart, des maladies incurables et dont le pronostic est fatal. L'hétérogénéité des symptômes moteurs dans ces maladies met en avant la vulnérabilité différentielle des populations de motoneurones pointant à nouveau l'importance de la diversité des MNs. Déterminer les voies de résistance ou de sensibilité préférentielle de populations différentes de MNs pourrait donc ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques. Parmi les maladies neuromusculaires, l'amyotrophie spinale infantile (SMA) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA), constituent deux exemples paradigmatiques de la vulnérabilité différentielle de populations distinctes de MNs.

La SMA fait partie du groupe des amyotrophies spinales proximales qui se caractérisent par une faiblesse et une atrophie des muscles de la racine des membres, à savoir des hanches, des épaules ainsi que des muscles du tronc. La forme dominante de la SMA est due à des mutations ou délétions d'un gène exprimé de façon ubiquitaire : Survival MN gene 1 (*SMN1*). Seul l'Homme possède une duplication centromérique du gène *SMN1*, appelée *SMN2* qui ne produit seulement que 10% de protéine fonctionnelle (Burghes and Beattie, 2009). La SMA est donc due à l'absence du gène *SMN1* et la sévérité de la maladie est directement corrélée au nombre de copies du gène *SMN2*. Bien que SMN soit une protéine ubiquitaire, le système moteur est préférentiellement atteint. En effet, SMA se définit par une dégénération progressive des MNs spinaux. Cette sensibilité différentielle pourrait s'expliquer en partie par une expression ubiquitaire lors du développement suivi d'une diminution de son niveau au cours des premières semaines postnatales pour rester principalement exprimée dans le SNC et le tissu musculaire (Bergin et al., 1997). SMN a la propriété de s'oligomériser et par la suite

d'interagir avec d'autres protéines pour former plusieurs complexes protéiques impliqués dans de nombreux processus cellulaires, notamment dans des processus de régulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement neuronal, la projection axonale, la survie, le transport axonale, et la formation des jonctions neuromusculaires (Burghes and Beattie, 2009; Eggert et al., 2006; Gabanella et al., 2005; Liu et al., 1997; Martínez-Hernández et al., 2013).

La SLA est une pathologie neurodégénérative identifiée par Jean marie Charcot en 1869 et qui est caractérisée par la mort sélective des MNs spinaux et du cortex moteur. Les patients sont atteints de faiblesse musculaire, spasmes puis paralysie amenant au décès des patients quelques années seulement après l'annonce du diagnostic (Ravits and La Spada, 2009). Bien que 90% des cas correspondent à des formes sporadiques, 10% des cas sont des formes familiales. De nombreux gènes ont ainsi été identifiés, dont le mieux décrit est celui codant la Superoxyde dismutase SOD1 (Rosen et al., 1993). Comme pour la SMA, les MNs ont une sensibilité différentielle dans la SLA selon leur identité (Kanning et al., 2010). Les MNs innervant les membres (CLM) sont préférentiellement atteints par la SLA. De plus, le système sympathique semble peu affecté dans la SLA, suggérant une « résistance » des MNs CPG (Fischer et al., 2004; Hegedus et al., 2007; Pun et al., 2006).

L'atteinte différentielle des populations des MNs dans ces deux pathologies soulignent l'importance de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la mise en place de la diversité motoneuronale à la fois en condition physiologique mais également pathologique. En particulier, définir les mécanismes à l'origine de la sensibilité ou de la « résistance » de certains sous-types motoneuronaux à une condition pathologique devrait permettre de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques. Cependant, accéder à ces sous-populations motoneuronales chez les patients est extrêmement difficile, voire impossible, en particulier à des stades présymptomatiques limitant les études de physiobiologie à l'utilisation de modèles animaux. De plus, la complexité des tissus neuronaux limite l'accès à certains sous-types de MNs pour des études génétiques et moléculaires, même chez l'animal.

Les MNs spinaux du système moteur participent au mouvement en formant les circuits sensori-moteurs et en ciblant les acteurs finaux du système nerveux somatique et du système nerveux parasympathique/sympathique. Afin de contrôler de manière coordonnée l'ensemble des muscles/ganglions de l'organisme, le schéma du circuit sensori-moteur se répète le long de l'axe R-C, mais s'organise différemment selon la position de l'organe cible effecteur. La spécificité des circuits sensori-moteurs et la projection correcte des MNs vers leur muscle cible nécessite une diversité de sous-types de MNs. Cette diversité des MNs semble être conservée chez l'Homme mais un nombre

limité de marqueurs moléculaires a permis de la caractériser. Cependant, cette diversité motoneuronale humaine s'illustre dans les maladies neurodégénératives où des populations distinctes de MNs sont affectées différemment. Une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la mise en place et au maintien de cette diversité est donc essentielle. Dans la partie suivante, je vais donc traiter des principes développementaux gouvernant la diversification motoneuronale.

## B. Formation de la diversité motoneuronale

Chez les vertébrés, la mise en place des colonnes et des pools de MNs le long de l'axe R-C est très largement orchestrée par les facteurs de transcription encodés par les gènes *Hox*. Dans le cadre de mon étude, je me suis intéressé à la régulation et l'expression des gènes *HOX* dans les MNs spinaux humains. Cependant, les études *in vivo* chez l'humain étant quasi-inexistantes, pour ce chapitre, je me suis focalisé sur les études réalisées *in vivo* chez la souris et le poulet.

### 1. Contexte général : Les gènes architectes HOX

Les gènes *Hox* constituent une large famille de gènes codant des facteurs de transcription. Ils définissent l'identité des différents segments du corps (fonction homéotique) le long de l'axe R-C et la morphogenèse des organes (fonction morphogénétique). En raison de ces fonctions, les gènes *Hox* sont qualifiés de gènes architectes. Ces facteurs de transcription se caractérisent par la présence d'une boîte à homéodomaine, une séquence de 61 acides aminés en motif hélice-boucle-hélice capable de se lier à l'ADN et qui permet aux protéines HOX de réguler l'activité de nombreux gènes cibles par activation ou répression de leur transcription.

#### a) Découverte des gènes *Hox* et de leur fonction

##### *i. Découverte des gènes *Hox* dans le modèle drosophile*

Le rôle des gènes *Hox* dans le développement a été découvert chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) en étudiant des mutants présentant des transformations homéotiques de segments corporels (Lewis, 1978). La mutation d'un gène *Hox* induit un défaut de morphogenèse restreint à un domaine de l'axe R-C comme la formation de pattes à la place des antennes chez la drosophile suite à l'expression ectopique au cours du développement larvaire du gène *Antennapedia* (Gibson and Gehring, 1988). Il a ensuite été démontré que la drosophile possède 8 gènes à boîte homéotique qui forment deux complexes : le complexe antennapedia (comprenant 5 gènes : *Labial*, *Peoboscipedi*, *Deformed*, *Sex comb reduced* et *Antennapedia*) et le complexe bitthorax (comprenant 3 gènes : *Ultrabithorax*, *Abdominal A* et *Abdominal B*). Par la suite, le clonage d'homologues de ces gènes a permis identifier les gènes *Hox* chez les vertébrés. L'expression des gènes *Hox* est conservée chez tous les animaux bilatériens mais leur nombre varient selon les espèces. Cette variabilité du nombre de

gènes *Hox* est associée à la duplication ou la perte de certains gènes au cours de l'évolution. Chez les vertébrés, il existe 4 complexes de gènes *Hox* nommés A,B,C, D (Duboule and Dollé, 1989).

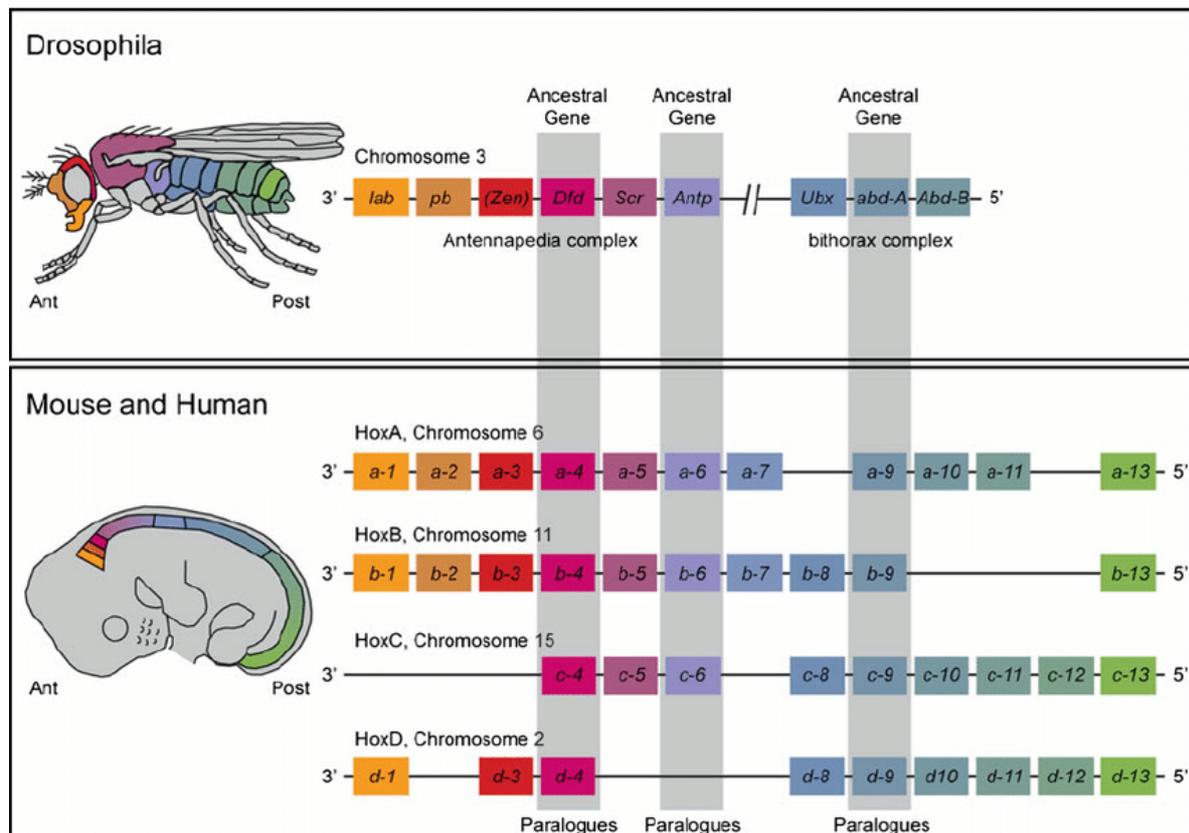
## ii. *Hox* : des facteurs de transcription

Les gènes *Hox* jouent un rôle principalement de facteurs de transcription même s'il a été montré qu'ils peuvent aussi être impliqués dans la régulation de la traduction. La plupart des gènes cibles connus des *Hox* codent pour des facteurs de transcription ou des protéines impliquées dans des voies de signalisation (Graba et al., 1997). L'activation de gènes cibles en réponse à l'expression d'un même code *Hox* diffère selon les tissus, suggérant l'implication de cofacteurs avec les *Hox* pour cibler les gènes cibles spécifiquement en fonction des tissus (Mann, 1995). De même, des analyses *in vitro* ont révélé que tous les *Hox* reconnaissent une séquence d'ADN, de 6 paires de bases riches en A/T, très présente dans le génome suggérant que la spécificité d'action de ces facteurs passe par l'interaction avec des cofacteurs (Noyes et al., 2008). De nombreux cofacteurs des *Hox* ont ainsi été découverts. Selon l'interaction des protéines *Hox* avec ces cofacteurs, les complexes formés vont cibler des gènes différents et permettre de réguler différents programmes transcriptionnels (Jaw et al., 2000; LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003; Mann et al., 2009). Parmi ces cofacteurs, la classe de protéines Tale a été particulièrement étudiée et comprend les protéines de la famille Pbx et de la famille Meis. La formation d'un complexe *Hox*-Pbx-Meis permet de réguler l'expression de gènes spécifiques en particulier dans le contexte de la formation des MNs (Mann and Chan, 1996; Moens and Selleri, 2006). Aussi, les *Hox* peuvent interagir avec les protéines CBP/p300 histone acétylase transférase (HAT) ou les histones désacétylases (HDAC) pour réguler la conformation chromatinienne. L'interaction des *Hox* avec les protéines HAT aboutit à l'ouverture de la chromatine et permet d'activer la transcription alors que l'interaction avec les HDAC réprime la transcription (Ladam and Sagerström, 2014).

## 2. L'expression des *Hox* chez les vertébrés

Chez la souris et l'Homme, cette famille de gènes est composée de 39 gènes divisés en 4 clusters, *Hox* A, B, C et D (Krumlauf, 1994). Dans les différents complexes, les gènes *Hox* occupant la même position linéaire sur le chromosome sont des gènes paralogues (Krumlauf, 1994). Ils possèdent une homologie plus importante entre eux que les différents gènes *Hox* d'un même cluster (Gaunt et al., 1989). Ces clusters sont localisés sur des chromosomes différents. Le nombre de gènes *Hox* dans chaque cluster oscille entre 9 et 11 et les paralogues sont au moins présents dans deux clusters (Pang

and Thompson, 2011) (Figure 7). Lors de la morphogénèse, les domaines d'expression des gènes *Hox* sont dépendants de leur position dans le complexe. Ainsi les gènes en 3' du complexe sont exprimés dans les régions post-occipitales les plus antérieures de l'organisme tandis que les gènes *Hox* en 5' sont exprimés dans les zones plus postérieures. Cette corrélation entre leur position dans le génome et leur zone d'expression est nommée colinéarité spatiale (Jung et al., 2014; Woltering et al., 2009).



**Figure 7 : Organisation des clusters *Hox* et leur expression le long de l'axe rostro-caudal.**

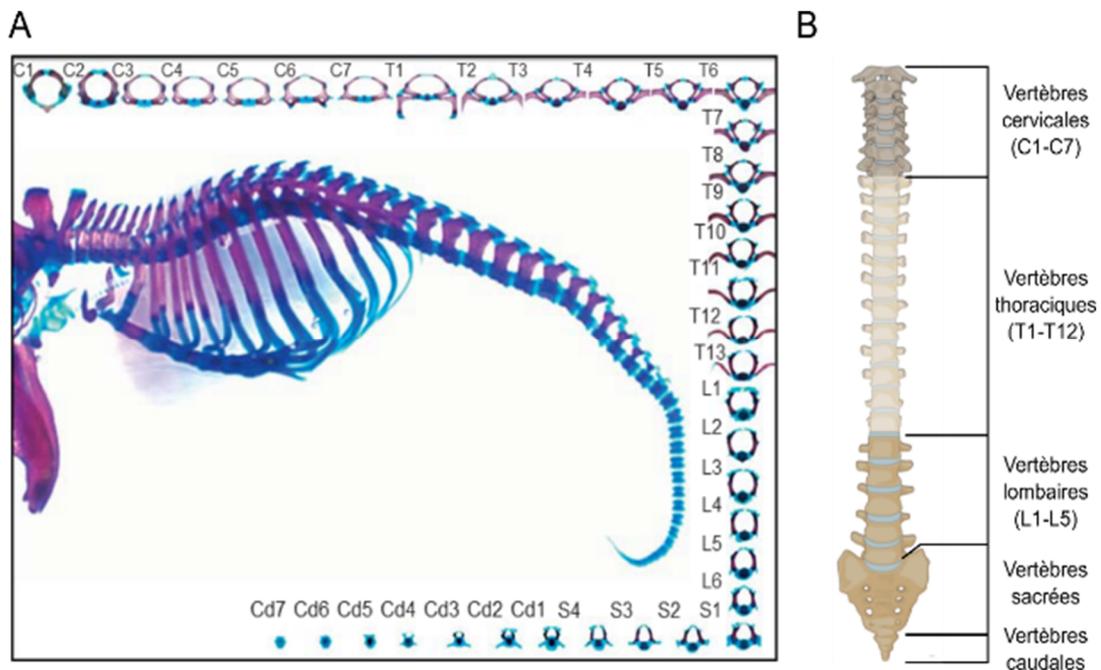
Organisation des gènes à homéodomaine du complexe-c dans la drosophile et l'organisation des gènes *Hox* sur les 4 clusters chez l'Homme et la souris. Chaque gène est exprimé dans une zone définie le long de l'axe rostro-caudal, représenté par un code couleur. Un hypothétique complexe homéotique ancestral est représenté, montrant leurs possibles relations phylogéniques entre les *Hox* paralogues. (Modifié d'après Pang et al., 2011)

#### a) [Les gènes \*HOX\* et la mise en place de l'axe rostro-caudal](#)

Des études de gains et pertes de fonction réalisées chez la souris et le poulet ont permis de montrer le rôle conservé des gènes *Hox* dans la mise en place de l'axe R-C. En effet, les combinaisons de protéines *Hox* exprimées (le code *Hox*) à un niveau donné instruisent l'identité positionnelle d'un domaine et sa diversification cellulaire subséquente. Ce rôle des *HOX* dans la mise en place de l'axe R-C et leur rôle dans l'acquisition de l'identité des cellules a d'abord été mis en évidence dans la formation du squelette. En effet de nombreuses études ont montré que l'inactivation ou l'expression

ectopique d'un ou plusieurs gènes *Hox* au cours du développement embryonnaire chez la souris impacte l'identité des vertèbres formées le long de l'axe R-C.

La colonne vertébrale est composée d'une série successive de vertèbres. Chaque vertèbre dérive d'une paire de somites formée lors de l'embryogenèse. Le nombre de vertèbres varie entre les espèces mais est identique entre les individus d'une même espèce. Le nombre défini de vertèbres pour chaque espèce est appelé la « formule vertébrale » (Gomez et al., 2008). Bien que les vertèbres d'un même organisme présentent une morphologie similaire, chacune peut être distinguée anatomiquement et associée à un domaine particulier le long de l'axe R-C. A titre d'exemple, la formule vertébrale de la souris est caractérisée par 7 vertèbres cervicales (C), 13 thoraciques (T) chacune avec une paire de côtes (les 7 antérieures rattachées au sternum, les 6 suivantes sont flottantes), 6 lombaires (L), 4 sacrales (S) et la queue est formée d'environ 30 vertèbres caudales. En comparaison, la formule vertébrale de l'Homme est approximativement la même, à l'exception que l'Homme possède 12 vertèbres thoraciques, 5 lombaires et seulement 3 à 5 vertèbres sacrées qui se fusionnent pour former le coccyx (Figure 8). Chaque vertèbre dérive d'une paire de somites formée au cours de l'élongation du corps axial.



**Figure 8 : Formule vertébrale chez la souris et l'Homme.**

(A) Vue latérale d'une colonne vertébrale de souris au stade E18.5, composée d'un nombre définis de vertèbres et anatomiquement distinguables. En périphérie, les vertèbres sont représentées de façon individuelles (sauf pour les vertèbres caudales, où seul les 7 premières vertèbres sur les 30 sont représentées). (B) Répartitions des vertèbres chez l'Homme, et les domaines des différents types de vertèbres.

(Modifié d'après Wellik et al., 2009)

C = Cervical, T = Thoracique, L = Lombaire, S = Sacral, Cd = Caudal

L'expression ectopique de protéines Hox induit une modification de l'identité des vertèbres. Ainsi, l'expression ectopique de *Hoxc6* dans un domaine plus postérieur que sa zone d'expression normale induit la formation d'une vertèbre thoracique supplémentaire se liant au sternum et la formation de vertèbres thoraciques à la place de vertèbres qui acquièrent normalement une identité lombaire. Ainsi, cette expression ectopique de *Hoxc6* induit une antériorisation des vertèbres, autrement qualifiée de « transition homéotique antérieure » (Jegalian and De Robertis, 1992). De manière similaire, la surexpression de *Hoxc8* dans le domaine postérieur à son expression normale induit également une antériorisation des vertèbres (Pollock et al., 1992). La surexpression de *Hoxa10* dans l'ensemble de la moelle induit une perte des vertèbres thoraciques et l'absence de formation du sacrum, issu de la fusion des vertèbres sacrées (Carapuço et al., 2005). De manière similaire, les expériences de perte de fonction confirment ce rôle des *Hox* dans la formation de l'identité régionale des vertèbres. La mutation d'un ou plusieurs gènes *Hox* localisés en position 3' du cluster va perturber l'identité des vertèbres antérieures de la colonne vertébrale tandis que la mutation de gènes *Hox* situés en position 5' va perturber l'identité des vertèbres caudales de la colonne vertébrale. La perte d'un seul gène *Hox* peut induire une antériorisation d'une partie des vertèbres, comme il peut induire une postériorisation voir modifier le nombre de vertèbres. En effet, la déficience en *Hoxc8* chez la souris aboutit à une conversion de la première vertèbre thoracique en une huitième vertèbre cervicale alors que souris n'exprimant pas *Hoxa11* ont une vertèbre lombaire à la place de la dernière vertèbre thoracique (Small and Potter, 1993; van den Akker et al., 2001). De plus, les phénotypes observés dans les souris mutées pour les gènes *Hox* paralogues ont des perturbations de l'identité R-C des vertèbres plus importantes que celles mutées pour un seul des paralogues. Un des exemples est l'effet mineur de l'inactivation des gènes *Hoxa4* ou *Hoxb4* ou *Hoxd4* sur la vertèbre C2/C3 chez la souris alors qu'une l'inactivation conjointe des quatre gènes *Hox4* induit une transformation des cervicales C2 à C5 en cervicales de phénotype C1 (Horan et al., 1995). Ces résultats confirment la redondance fonctionnelle entre les gènes *Hox* d'un même groupe paralogue (Krumlauf, 1994; Mallo et al., 2009; Wellik, 2009).

Ces études montrent que les gènes *Hox* ne contrôlent pas la disposition de base du plan corporel des vertébrés (tête, tronc, queue), mais que leur expression en combinatoire encode l'identité positionnelle des cellules permettant ainsi la mise en place des « bonnes structures au bon endroit » le long de l'axe R-C. L'expression différentielle des gènes *Hox*, leur rôle dans le codage de l'information positionnelle et la diversification des types cellulaires le long de l'axe R-C ont été plus tardivement démontrés dans la moelle épinière et en particulier dans la formation de la diversité des motoneurones.

## b) Domaines d'expression des ARNm et des protéines Hox dans la moelle épinière

Comme dans les autres tissus, les gènes Hox sont exprimés différemment le long de l'axe R-C de la moelle épinière. Leur domaine d'expression est là aussi en accord avec la notion de colinéarité spatiale, comme décrit précédemment.

En effet, des études par hybridation *in situ* et immunomarquage des Hox au cours du développement embryonnaire chez poulet et la souris ont permis de déterminer l'expression des différents membres (Burke et al., 1995; Catela et al., 2016; Dasen et al., 2005; Ensini et al., 1998; Gaunt, 1988; Gaunt et al., 1989; J. P. Liu et al., 2001) (Figure 9). Globalement les gènes des clusters *HoxA* et *HoxC* sont exprimés séquentiellement en fonction de leur position sur le chromosome dans les MNs depuis le domaine cervical jusqu'au domaine lombaire (Dasen et al., 2005; J. P. Liu et al., 2001; Philippidou et al., 2012). *Hoxa5* et *c5* sont exprimés dans les MNs de la partie cervicale de la moelle et s'étendent jusqu'à la partie brachiale antérieure où ils sont exprimés avec *Hoxa6* et *Hoxc6*. Ces derniers sont coexprimés avec *Hoxc8* et *Hoxa8* dans la partie brachiale caudale et s'étendent dans la région thoracique antérieure. Puis, les paralogues *Hoxa9* et *c9* sont exprimés dans la partie thoracique et les paralogues *Hox10* en lombaire suivis des paralogues *Hox11* dans la partie lombaire caudale et sacrée antérieure (Philippidou and Dasen, 2013). Une exception notable à cette règle est l'expression de *Hoxc4* qui est exprimé dans les segments cervicaux jusqu'au segment brachial caudal.

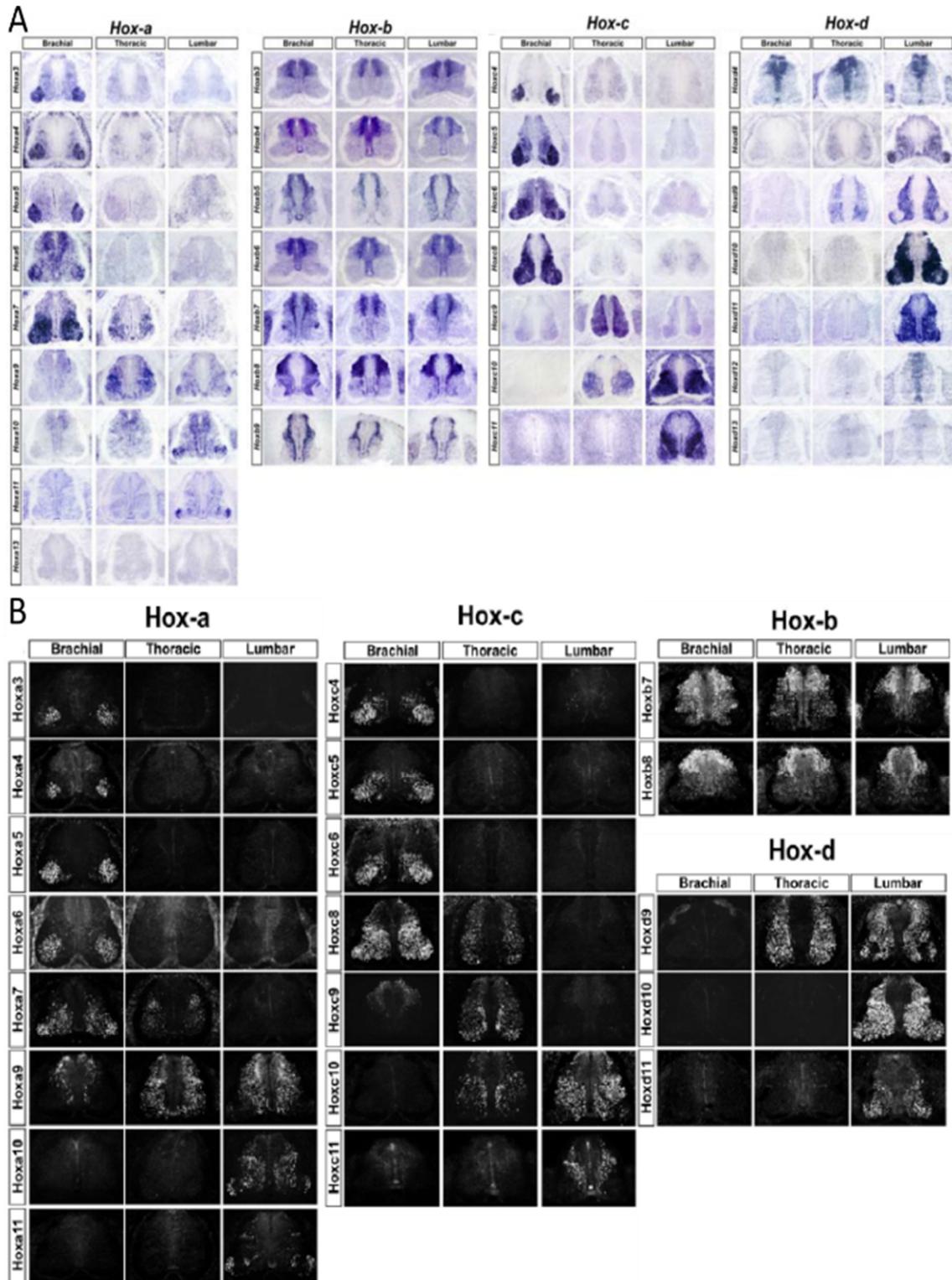


Figure 9 : Domaine d'expression des différents Hox (3-13) le long des différents domaines brachiaux, thoraciques, lombaires de la moelle épinière chez le poulet au stade 30HH (6 jours post fécondation).

(A) Domaines d'expression transcriptionnel des *Hox* par *hybridation in situ*. (B) Domaine d'expression protéique des *Hox* par immunomarquage. (Modifié d'après *Dasen et al., 2005*)

Dans le cas des gènes *Hox* du cluster D, les analyses d'expression des gènes *hoxd* 9 à 11 montrent qu'ils sont exprimés selon cette règle de colinéarité spatiale. Ainsi *Hoxd9* est exprimé dans les MNs thoraciques caudaux et *Hoxd10* et *Hoxd11* dans les segments lombaires. En revanche *Hoxd8* semble exprimé tout le long de la moelle épinière (Tschopp et al., 2012). Cette expression non régionalisée dans la moelle se retrouve pour les gènes du complexe *HoxB* qui présentent une expression continue dans la partie dorsale de la moelle épinière de poulet (Dasen et al., 2005). Cette observation se fait aussi dans la souris (Jung et al., 2010; Lacombe et al., 2013).

Ces études ont donc permis de montrer des expressions différentielles des gènes *Hox* correspondant aux « segments » de la moelle épinière et la mise en place d'un code Hox qui identifie des populations distinctes de MNs : *Hoxa/c5/c4* définissant les MNs cervicaux, *Hoxc4*, *a/c5* et *a/c6* les MNs brachiaux antérieurs, *Hoxc4*, *a/c6-Hoxa7/c8* les MNs brachiaux caudaux, *Hoxc9* les MNs thoraciques qui se distinguent par la coexpression de *Hoxc9* avec *Hoxc8* dans sa partie la plus antérieure et avec *Hoxd9* dans la partie la plus caudale. Enfin les gènes *Hoxa/c10* sont principalement exprimés par les MNs Lombaires (Philippidou and Dasen, 2013) qui expriment aussi *Hoxc11* dans la région lombaire caudale. Ils se trouvent que cette répartition rostro-caudal correspond, comme nous l'avons vu préalablement, à la formation dans chaque segment de différentes colonnes de MNs. Nous allons voir que la formation de ces colonnes et des pools dépend en grandes parties des Hox.

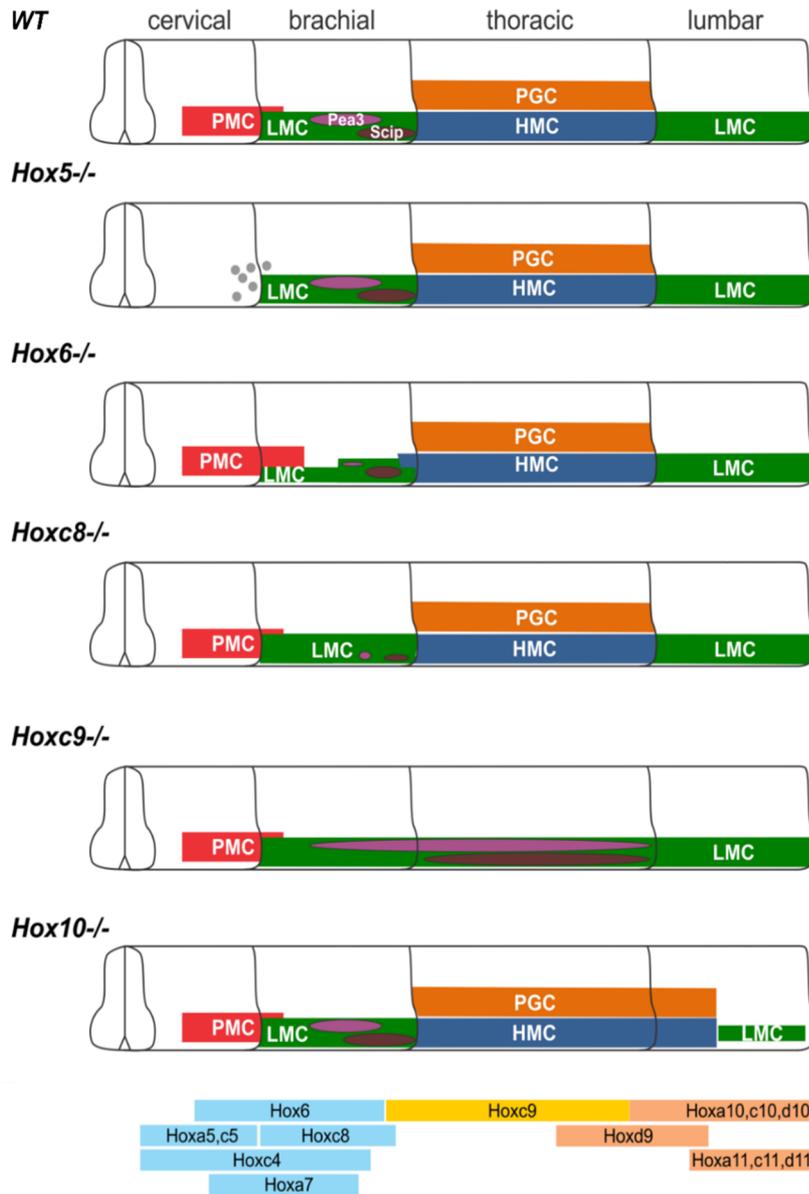
### 3. Spécification des sous-types de MNs par les gènes *Hox*

En accord avec leurs domaines d'expression dans les MNs, des études par perte et gain de fonction montrent que les gènes Hox participent à l'acquisition de l'identité positionnelle des MNs le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière, gouvernant la formation des colonnes et des pools.

#### a) Rôle des gènes *Hox* dans la spécification des colonnes de MNs

L'influence des gènes *Hox* sur la diversification des MNs a ainsi été démontrée par des expériences de perte et de gain fonction principalement chez le poulet et la souris. L'expression ectopique de gènes *Hox* conduit à des changements d'identité des MNs. Ainsi l'expression ectopique, au cours du développement embryonnaire, de *Hoxc9* au niveau du segment brachial ou de *Hoxc6/c10* dans le segment thoracique modifient la formation des colonnes de MNs. A titre d'exemple, l'expression ectopique de *Hoxc6* dans le domaine thoracique induit la formation de MNs *Lhx1+* et *Raldh2+*, caractéristiques des MNs de la CMLI du domaine brachial. De même, la surexpression de

Hoxc9 est suffisante pour réprimer la formation de la colonne CML dans le domaine brachial où elle est remplacée par des colonnes CMM et CMH et surtout CPG qui est caractéristique du domaine thoracique. Les MNs brachiaux convertis en CPG projettent leur axone vers les neurones ganglionnaires, les MNs thoraciques CPG convertis en CML suite à une expression ectopique de HOXC6/C10 vont projeter eux vers les muscles des membres (Dasen et al., 2005; Shah et al., 2004). Ces résultats montrent le rôle instructeur des Hox sur la formation de l'identité des MNs. Des expériences de perte de fonction des *Hox* durant le développement embryonnaire de la souris complètent ces résultats (Figure 10) (Philippidou and Dasen, 2013). Ainsi, par exemple, les MNs phréniques disparaissent dans les mutants *Hoxa5* tandis que la perte des paralogues a6 et c6 érodent l'identité CML contenant les MNs innervant les membres, en particulier dans la région antérieure de la colonne. L'action des Hox sur la spécification de cette colonne motrice est médiée par leur interaction avec des cofacteurs comme le facteurs de transcription *Foxp1* qui est essentiel pour la formation de la CML (Dasen et al., 2008). Un autre exemple frappant est la reprogrammation de la région thoracique en MNs prenant une identité type de la CML dans les mutants *Hoxc9*. En effet les MNs marqueurs de cette colonne sont étendus dans le domaine thoracique et remplacent les MNs préganglionnaires. Les Hox ont donc un rôle instructif dans la spécification des identités positionnelles des MNs dans la moelle se traduisant par une modification des colonnes de MNs.



**Figure 10 : Effet des pertes de fonctions des gènes *HOXs* sur la formation des populations de MNs.**

Dans la moelle épinière saine (WT), l'expression des gènes *Hox4* à *Hox11* s'aligne sur les sous-types de colonnes et de pools de MNs. Les domaines d'expression des gènes *Hox6*, *Hoxc9*, *Hox10* recouvrent les domaines brachiaux, thoraciques et lombaires. Dans les conditions mutées de *Hox5*-*Hox10*, la perte d'expression d'un *Hox* perturbe la formation des MNs en colonne ou en pool. Les *Hox5* sont nécessaires à la spécification des MN CMP et l'expression de *Hoxc9* est nécessaire à la spécification des MNs des CMH et CPG. L'inactivation des gènes *Hoxc6* ou des gènes paralogues *Hox10* modifient la proportion de MNs différenciés vers une identité en colonne CML. L'inactivation de *Hoxc6* ou *Hoxc8* perturbe la spécification des MNs CML en pool. (Modifié d'après Philipidou et al., 2013)

CMP = colonne motrice phrénique, CML = Colonne motrice latérale, CMH = Colonne motrice Hypaxiale, CPG = Colonne préganglionnaire.

## b) Rôle des Hox dans La formation des pools de motoneurones

Des expériences de gain ou perte de fonction des gènes *Hox* dans l'embryon de poulet ont mis en évidence leur rôle dans la formation des pools de MNs (Dasen et al., 2005).

L'exemple de la formation des MNs Pea3+ au niveau des domaines CML illustre ce processus. La spécification de MNs Pea3+ dépend de l'activité de Hoxc6, qui interagit avec les complexes Pbx pour induire l'expression de gènes associés à la différenciation des colonnes CML (Foxp1 fort) et la coexpression Hoxc6/Foxp1 permet la transcription du gène Pea3+. Bien que la spécification des pools de MNs dépende de facteurs intrinsèques que sont les Hox (Rouso et al., 2008), des facteurs extrinsèques vont également intervenir dans cette spécification. La compétence des MNs à répondre au GDNF (vu dans la partie I) semble s'accorder avec le profil d'expression des Hox. La perte d'expression de Hoxc6 et de Hoxc8 prévient la formation des MNs Pea3+ (Lacombe et al., 2013; Vermot et al., 2005). Comme l'expression de Pea3 dépend du GDNF périphérique, ce résultat suggère le rôle de Hoxc6 et Hoxc8 dans la mise en place de la compétence des MNs à répondre au GDNF. Inversement, l'expression ectopique de Hoxc8 dans le domaine thoracique suffit à allonger le domaine du pool MN PEA3+, suggérant que Hoxc8 participe à rendre des MNs compétents à répondre au GDNF (Dasen et al., 2005).

En résumé, la formation des pools peut se résumer de façon schématique en 2 phases :

- 1) Spécification HOX-dépendante le long de l'axe R-C spécifiant les MNs selon leur position et dirige la projection axonale vers les cibles appropriées.
- 2) Raffinement de la spécification des MNs en réponse aux signaux extrinsèques sécrétés par leurs muscles cibles après la connexion synaptique établie.

L'ensemble de ces études montrent que l'expression combinatoire des gènes Hox jouent un rôle primordial dans la diversification des MNs en contrôlant la formation des colonnes CML et PGC respectivement aux niveaux brachial et lombaire pour la première et au niveau thoracique pour la seconde. De plus, ce vaste programme génétique est réutilisé pour la formation des pools de MNs et la mise en place des projections vers les muscles des membres. De plus, certaines combinaisons de Hox permettent de rendre des groupes de MNs compétents à répondre à des signaux provenant de la périphérie qui vont contribuer eux aussi à la diversification des MNs (cas de *Pea3*). Ainsi, les Hox gouvernent l'identité des sous-types de MNs et comme ils sont exprimés sélectivement par différentes populations ils peuvent être utilisés comme des marqueurs de l'identité des MNs sur l'axe R-C.

L'ensemble de ces travaux montrent que comprendre la formation de la diversité motoneuronale et être capable de la reproduire *in vitro* passe par la compréhension de la mise en

place des profils d'expression des facteurs de transcription Hox. Ces patrons d'expression se mettent en place très tôt au cours du développement lors de la gastrulation et de la formation de la moelle épinière. Je vais donc à présent aborder les mécanismes régulant 1) la formation de la moelle épinière à partir de cellules souches progénitrices qui sont situées dans la région caudale de l'embryon et où se mettent en place l'expression des gènes Hox, et 2) comment à partir de ces progéniteurs sont spécifiés les MNs.

## C. Mise en place de la diversité des motoneurones spinaux lors de la formation de la moelle épinière

### 1. Elongation axiale lors de l'embryogenèse : signaux, types cellulaires et différenciation neurale.

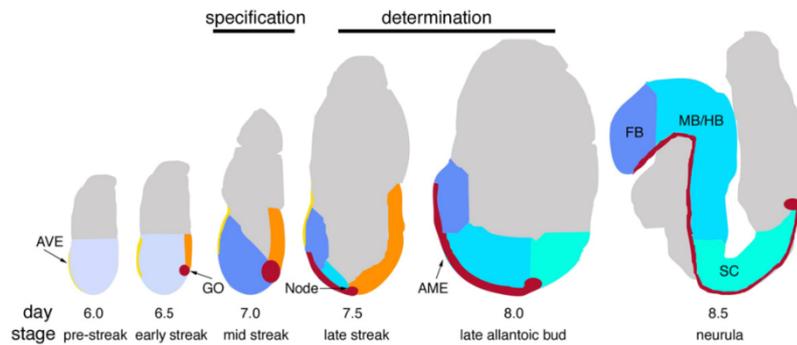
La spécification des différents types de MNs spinaux présents le long de l'axe rostro-caudal de la moelle se fait progressivement lors de l'élongation axiale de l'embryon. Cette élongation, depuis les segments cervicaux nés précocement jusqu'aux segments sacrés nés les derniers, est nourrie par des progéniteurs souches présents dans la partie caudale de l'embryon qui donnent naissance à des progéniteurs neuronaux puis aux progéniteurs de motoneurones et enfin aux motoneurones post-mitotiques.

#### a) Formation de la partie caudale de l'embryon

A l'heure actuelle, le modèle prévalant de la formation et de la régionalisation de la plaque neurale est basé sur le modèle d'activation/transformation qui propose que le tissu neural est d'abord induit en acquérant par défaut une identité antérieure, puis est ensuite postériorisé par des signaux gradués permettant la spécification du mésencéphale, rhombencéphale et dans sa partie la plus caudale la moelle épinière (Nieuwkoop and Nigtevecht, 1954; Stern et al., 2006). Cependant, il apparaît, de plus en plus clairement, que chez les amniotes ce modèle semble valide pour la formation du système nerveux jusqu'à la fin du tronc cérébral mais que la moelle épinière se forme différemment (Steventon and Martinez Arias, 2017).

En effet, les régions post-occipitales de l'embryon se forment progressivement lors de la croissance de la région caudale de l'embryon (Figure 11,12) (Levine and Brivanlou, 2007). Cette élongation axiale est dépendante de structures se mettant en place au tout début de la gastrulation, à savoir la ligne primitive et le nœud primitif (Barrow et al., 2007; Charrier et al., 1999; Liu et al., 1999). Puis plus tard, le bourgeon caudal servira pour la formation de la queue. La ligne primitive représente la première manifestation de mise en place de l'axe R-C dans l'embryon (Barrow et al., 2007). L'élaboration de repère de développement embryonnaire du poulet est divisée en 46 étapes définies par Hamilton et Hamburger (HH) et en jour post-fécondation pour la souris (E = jour) (Hamburger and Hamilton, 1992). A partir du stade HH5 chez le poulet et E7 chez la souris le nœud et la ligne primitive vont progressivement régresser (Figure 11, 12). Pendant cette période, les cellules du nœud et de la ligne primitive vont donner naissance à des dérivés mésodermiques et à la partie caudale de la plaque

neurale correspondant à la moelle épinière (Figure11,12). La spécification de ces dérivés a lieu progressivement depuis les régions antérieures de la partie post-occipitale jusqu'aux régions les plus caudales de la queue formée vers E10,5 chez la souris.

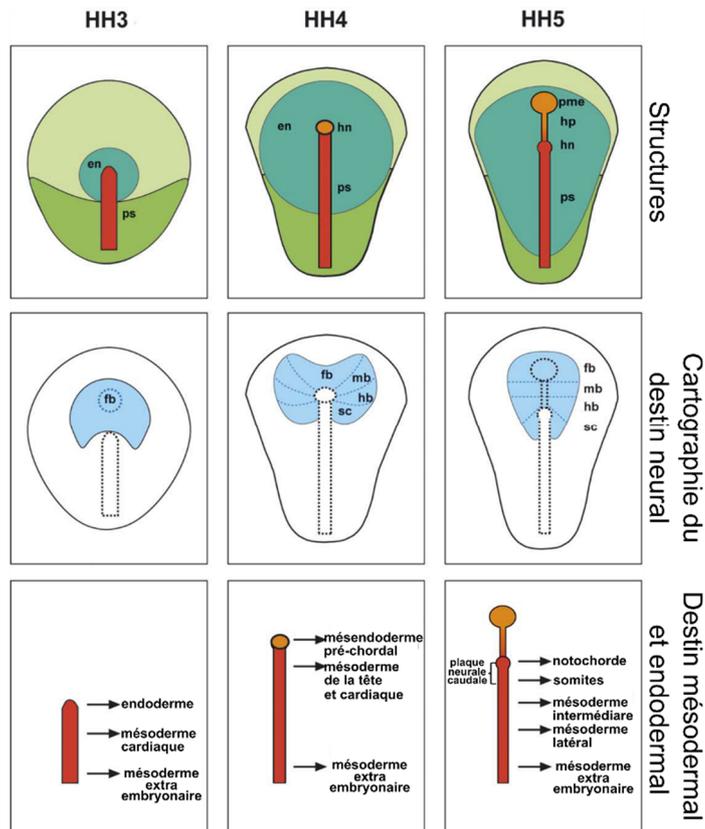


**Figure 11 : Induction neurale dans les embryons de souris au jour 6.0 à 8.5 du développement.**

L'épiblaste de l'embryon de souris (jours 6 à 6,5) existe dans un état pré-neural (bleu clair). Aux stades antérieurs, le seul signe de polarité embryonnaire est l'endoderme viscéral antérieur (AVE, en jaune) recouvrant l'épiblaste antérieur. Au début de la gastrulation, la ligne primitive précoce (orange) se forme dans l'embryon postérieur, avec l'organisateur de la gastrula (GO, marron antérieur à la ligne). Au niveau de la moitié de la formation de la ligne, l'AVE a migré de manière proximale, la ligne primitive s'est allongée de manière distale et les marqueurs précoce de l'identité neural sont exprimés (en bleu) dans la moitié distale / antérieure de l'embryon. Ces marqueurs représentent la spécification du tissu neural. Au fur et à mesure de la gastrulation, les précurseurs neuraux antérieurs (en bleu) migrent vers la partie antérieure pour se juxtaposer à l'AVE. Le nœud situé à l'extrémité distale de l'embryon aux stades tardifs la ligne primitive et le mésendoderme antérieur (AME, marron) s'étend en avant du ganglion au cours des stades tardifs de la strie et du bourgeon allantoïque. La formation du tissu neural antérieur se produit aux stades tardifs de la ligne primitive et est complète au stade tardif du bourgeon allantoïque. En E8.5, l'induction neuronale est presque terminée et la plaque neurale commence à former un tube par neurulation. Le tissu neural est constitué du cerveau antérieur (FB, bleu), du cerveau moyen (MB, bleu clair), du cerveau postérieur (HB, bleu clair) et de la moelle épinière (SC, turquoise). Le mésendoderme antérieur recouvre le tissu neural et est nécessaire à son maintien.

AVE = endoderme viscérale antérieur, GO = Organisateur de la gastrula, FB = prosencéphale, MB = mésencéphale, HB = rhombencéphale, sc= moelle épinière.

(Adapté d'après Levine et al., 2007)



**Figure 12 : Etapes de l'induction neurale et la spécification en domaine chez l'embryon de poulet.**

Description par rangée : 1) au stade HH3 la ligne primitive s'allonge et l'endoderme définitive se met en place. HH' : La ligne primitive s'est étendue à son maximum et une structure se met en place à son extrémité antérieure : le nœud de Hensen (hn) (nœud primitif chez la souris ou l'Homme). HH5 : Le nœud de Hensen génère l'endoderme préchordale (pme) et enclenche le processus de formation de la tête (hp). Seconde rangée : représentation de la régionalisation du destin de l'épiblaste ectodermale. La plaque neurale induite est affichée en bleue. Les premiers domaines de la plaque neurale dérivent de la spécification de l'ectoderme (HH3). Au stade HH4 la régionalisation R-C de la plaque neurale est définie, notamment par la formation des zones des futures prosencéphale (fb), mésencéphale (mb), rhombencéphale (hb) et moelle épinière (sc). Cependant, la partie neurale donnant la moelle épinière dépend de cellules dérivées d'une région caudale du nœud de Hensen et de la partie antérieure de la ligne primitive. Cette zone participe à la fois à la formation caudale de la plaque neurale (sc) et à la formation du mésoderme. Dernière rangée : destin mésodermale et endodermale des cellules dérivées de la ligne primitive à différentes positions. en = endoderme, ps = ligne primitive, pme = mésoderme préchordale, hp = processus de formation de la tête, hn = nœud de Hensen, fb : prosencéphale, md : mésencéphale, hb = rhombencéphale, sc = moelle épinière.

(Modifié d'après Wittler et al., 2004)

Différents modèles d'inactivation de gènes chez la souris ont montré que le maintien des cellules progénitrices axiales et l'élongation de l'embryon passe par l'activité des voies WNT (Wingless-Type), FGF (Facteurs de croissance fibroblastique), Notch (Tableau 1). Ces voies de signalisation agissent via l'induction des facteurs de transcription Cdx2 (homéoboîte de type caudale 2) et Brachyury (Bra) qui régulent de nombreuses cibles essentielles à la spécification et au maintien des progéniteurs axiaux. La perturbation de ce réseau de facteurs sécrétés et de facteurs de transcription qui maintiennent les cellules progénitrices entraîne leur différenciation et la formation du tissu neural ou du tissu mésodermale.

## b) Les voies de signalisation

### i. *La voie WNT*

La voie de signalisation WNT est indispensable à la formation de la moelle épinière. La famille de gènes *Wnt* codent des glycoprotéines dont plusieurs sont impliquées dans la formation de l'axe R-C. L'activité et le rôle de la voie Wnt dans l'élongation de la moelle épinière est conservée au sein de plusieurs espèces illustrant l'importance de cette voie dans ce processus (Nordström et al., 2002; Shimizu et al., 2005; Sokol, 1996). Des études d'hybridation *in situ* mettent en évidence l'expression de *Wnt3* dans les cellules de la ligne primitive (Rivera-Pérez and Magnuson, 2005). Les souris invalidées pour *Wnt3* présentent une absence de formation de cette ligne, du nœud caudal et un défaut d'élongation de la moelle épinière (Barrow et al., 2007; Liu et al., 1999). A l'image des souris invalidées pour *Wnt3*, l'invalidation de *Wnt3a* conduit à une troncation de la partie caudale du corps (Takada et al., 1994; Young et al., 2009) (table 1). De plus, d'autres acteurs de la famille Wnt, comme *Wnt5a*, sont impliqués dans le bon déroulement de l'élongation axiale (table 1).

L'invalidation chez la souris de gènes impliqués dans la voie de signalisation canonique de WNT, comme la *β-caténine*, entraîne un phénotype similaire aux souris *Wnt3a*<sup>-/-</sup> (table1). Ces résultats montrent que le rôle de Wnt dans l'élongation nécessite l'activation de sa voie canonique. L'impact de Wnt sur l'élongation passe par l'activation directe de facteurs de transcription nécessaires à l'élongation axiale mais aussi probablement par son rôle sur l'induction de facteurs de la voie des Fgf comme le *Fgf8* qui joue lui aussi un rôle important dans la stimulation de l'élongation (voir plus bas). En effet *Fgf8*, est très fortement diminuée dans les souris invalidées pour *Wnt3* ou pour *β-caténine* sélectivement dans l'épiblaste (Olivera-Martinez and Storey, 2007).

**Tableau 1 : Liste de mutation de gène codant pour des composants de voie de signalisation qui induisent la formation tronquée de la partie caudale de l'embryon de souris**

(de Wilson et al., 2009)

Mutant gene	Phenotype	References
<b>Fgf signalling</b>		
<i>Fgfr1</i> <sup>-/-</sup>	Die at gastrulation, accumulation of cells at the caudal streak, severe reduction in paraxial mesoderm formation.	Deng et al., 1994; Yamaguchi et al., 1994
<i>Fgfr1</i> <sup>-/-</sup> and wild-type chimaeric embryos	Caudal truncations; tail distortion; spina bifida; ectopic neural tubes.	Ciruna et al., 1997; Deng et al., 1997; Ciruna and Rossant, 2001
<i>Fgfr1</i> <sup>fl/+</sup> ;T-Cre*	Axial truncations in the sacral and tail regions; cervical vertebrae normal, thoracic and lumbar progressively fused.	Wahl et al., 2007
<i>Fgf8</i> <sup>-/-</sup>	Cells move into the streak but do not come out, no mesoderm forms.	Sun et al., 1999
<b>Wnt signalling</b>		
Vestigial tail ( <i>Wnt3a</i> hypomorph) mutant	Axis truncation, distal to first caudal vertebrae; caudal NT closure defects; crossed to <i>Wnt3a</i> null, less <i>Wnt3a</i> , more rostral vertebral defects.	Greco et al., 1996; Gruneberg and Wickramaratne, 1974; Takada et al., 1994; Yoshikawa et al., 1997
<i>Wnt3a</i> <sup>-/-</sup>	Axis truncation, distal to the forelimb, no tailbud forms; one ectopic ventral NT.	Takada et al., 1994; Yamaguchi et al., 1999b
<i>Wnt5a</i> <sup>-/-</sup>	Axis truncation from sacral vertebrae 0-4, no caudal vertebrae; vertebral fusions, and vertebrae are also shorter than in wild type.	Yamaguchi et al., 1999a
<i>Lrp6</i> <sup>-/-</sup>	Axis truncated distal to lumbar vertebrae; caudal neuropore closure defects; die at birth; <i>Wnt3a</i> down, mesoderm missing, excess neural tissue.	Pinson et al., 2000
<i>Dkk1</i> <sup>dl/dl</sup> - (doubleridge mutant)	Lower <i>Dkk1</i> expression, hypomorphic allele; kinked tails (vertebral fusions).	MacDonald et al., 2004
Axin (fused mutant) <i>β-catenin</i> <sup>fl/+</sup> ;T-Cre <sup>+</sup>	Kinking and shortening of the tail. Severe axis truncation after a few somites.	Reed, 1937; Zeng et al., 1997 Aulehla et al., 2008
<b>Notch signalling</b>		
<i>Notch1</i> <sup>-/-</sup>	Developmental arrest around E9.	Conlon et al., 1995; de la Pompa et al., 1997
<i>Rbpj</i> <sup>-/-</sup>	Developmental arrest around E9.	de la Pompa et al., 1997
<i>Lfng</i> <sup>-/-</sup>	Axis truncation, sacral and caudal vertebrae missing; vertebrae fused and malformed in cervical, thoracic and lumbar.	Evrard et al., 1998; Shifley et al., 2008; Zhang and Gridley, 1998
<i>Dll3</i> <sup>-/-</sup> (pudgy mutant)	Tail truncation, vertebrae missing from caudal 5-10; skeletal disorganisation from vertebra cervical 1.	Dunwoodie et al., 2002
<i>Ps1</i> <sup>-/-</sup>	Some caudal vertebrae missing; vertebrae fused.	Wong et al., 1997; Donoviel et al., 1999
<b>Retinoid signalling</b>		
<i>Cyp26a1</i> <sup>-/-</sup>	Axis truncation around hindlimb level; cervical and thoracic vertebrae caudal transformations, vertebrae behind L1 missing or so malformed that they are impossible to identify; caudal NT open.	Abu-Abed et al., 2001
<i>Por</i> <sup>-/-</sup>	Die at E9.5; caudal truncation from around the first caudal vertebrae.	Otto et al., 2003; Ribes et al., 2007
<i>Gcnf</i> <sup>-/-</sup>	Die at 10.5; halt in somitogenesis after 13 somites; open NT; tail bud develops ectopically outside the yolk sac.	Chung et al., 2001
<b>BMP signalling</b>		
<i>Nog</i> <sup>-/-</sup>	Axis truncation, loss of caudal vertebrae; open NT; shortened axis.	Goldman et al., 2000; McMahon et al., 1998
<b>FGF and Wnt targets</b>		
Brachyury ( <i>T</i> mutant)	Tail truncated in heterozygous mice, after a few caudal vertebrae.	Dobrovolskaia-Zavadskaia, 1927; Herrmann et al., 1990; Yamaguchi et al., 1999b
Tc ( <i>T</i> antimorph)	Post-anal tail truncated.	MacMurray and Shin, 1988
<i>Cdx2</i> <sup>+/-</sup>	Mild axis truncation, vertebrae missing from C26-28; caudal transformations.	Chawengsaksophak et al., 1997
<i>Cdx1</i> <sup>+/-</sup> ; <i>Cdx2</i> <sup>+/-</sup>	Axis truncation, vertebrae missing from C15-20; caudal transformations.	van den Akker et al., 2002
<i>Cdx1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Cdx2</i> <sup>+/-</sup>	Axis truncation, vertebrae missing from C6-11; caudal transformations of vertebrae along the length of the spinal cord.	van den Akker et al., 2002
*Conditional null homozygous for <i>Fgfr1</i> floxed in a T-Cre background. †Conditional null homozygous for <i>β-catenin</i> floxed in a T-Cre background. NT, neural tube.		

## ii. [Les voies FGF et Notch](#)

Les voies FGF et Notch jouent un rôle primordial dans la formation de la partie postérieure du corps. En effet, la délétion des gènes *Fgf4* et *Fgf8* conduit à la troncation de l'axe au niveau des bourgeons des membres antérieurs, un phénotype très similaire au mutant *Wnt3a* (Naiche et al., 2011). La délétion du gène *Fgfr1*, récepteur principal de *Fgf8*, exprimé par l'ensemble de l'épiblaste produit un phénotype similaire mais moins sévère (Wahl et al., 2007). Le rôle de la voie FGF a été également étudiée dans le zebrafish et le poulet, où la surexpression d'une forme dominante négative du récepteur *Fgf* (Holowacz and Sokol, 1999) ou l'inhibition des récepteurs *Fgf* (Bénazéraf et al., 2010) induit la formation tronquée de la partie axiale du corps. Ces similarités phénotypiques entre les mutants des voies FGF et WNT laissent supposer que ces deux voies agissent en synergie dans la promotion d'élongation de l'axe R-C ainsi que dans le maintien de l'activité des cellules souches caudales de l'épiblaste (Figure 13) (Boulet and Capecchi, 2012; Mathis et al., 2001). De plus, la voie FGF interagit aussi avec la voie Notch pour assurer le maintien de cette population de cellules souches ainsi que pour contrôler leur prolifération (Akai, 2005). La voie Notch joue un rôle conservé dans le maintien de la zone proliférative en bloquant la différenciation des cellules progénitrices axiales par inhibition de contact (del Álamo et al., 2011). La voie FGF induit l'expression de membres de cette voie de signalisation dans la partie caudale de l'embryon. Les souris mutantes pour divers acteurs de la voie Notch présentent une formation tronquée de la partie postérieure du corps (de la Pompa et al., 1997; Dunwoodie et al., 2002; Evrard et al., 1998). De même, des pertes de fonction de Notch chez le poulet diminuent la prolifération des cellules situées dans la zone proliférative caudale de l'embryon (Akai, 2005). Une partie de l'activité de la voie FGF sur l'élongation pourrait donc passer par un maintien des cellules proliférantes via la voie Notch. La diminution de *Fgf* entraînerait alors une entrée de cellules progénitrices vers la voie de différenciation en accord avec de nombreux autres résultats comme nous le verrons dans la partie traitement de la différenciation vers la voie neurale.

Les voies FGF et WNT participent à l'élongation via des gènes cibles communs tel que les facteurs de transcriptions *Cdx* et *Brachyury*.

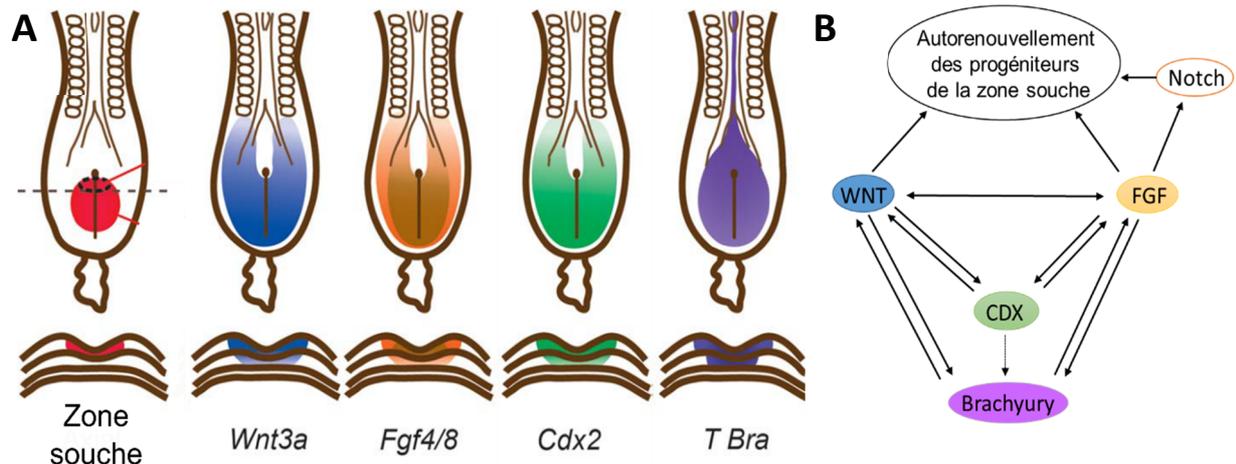
## c) [Les facteurs de transcription](#)

### i. [Cdx2](#)

L'induction des gènes à homéoboite *Cdx* dans la ligne primitive et le nœud primitif est essentiel pour l'élongation de l'axe (Figure 13) (Ikeya and Takada, 2001; Metzis et al., 2018; Pilon et al., 2006). Leurs expressions débutent dans la ligne primitive puis ils sont exprimés séquentiellement dans l'ensemble des feuilletts embryonnaires de la partie caudale de l'embryon. Chez la souris, *Cdx1* est

observé au stade E7.5 (Meyer and Gruss, 1993). L'expression de *Cdx2* est initiée au stade E8.5 dans tous les feuilletts embryonnaires de la région caudale du corps et perdure pendant l'élongation dans la plaque neurale et le bourgeon caudale. *Cdx4* est observé au stade E7.5 dans la partie caudale de la ligne primitive et son domaine d'expression s'étend dans le paraxial mésoderme jusqu'à la limite du dernier somite en cours de formation, et dans le neurectoderme (Gamer and Wright, 1993). Le rôle des gènes *Cdx* dans l'élongation axiale a été premièrement observé dans un modèle murin présentant une altération de l'élongation axiale suite à l'inactivation de *Cdx2* (Chawengsaksophak et al., 1997). *Cdx1* et *Cdx4* semblent coopérer avec *Cdx2* puisque leur mutation individuelle n'induit pas de défaut d'élongation. En revanche, la diminution de leur dose dans les mutants *Cdx2* induit un défaut d'élongation de la moelle épinière plus marqué que les souris *Cdx2*<sup>-/-</sup> (Savory et al., 2009; van den Akker et al., 2002; van Nes et al., 2006). De façon intéressante, les anomalies d'élongation chez la souris sont similaires à celles observées en l'absence de *Wnt3a* et de *Fgf4/8* (Shimizu et al., 2005; Takada et al., 1994; Young et al., 2009). Cela s'explique par le fait que ces deux voies induisent la transcription des gènes *Cdx* et ceci montre qu'au moins une partie de l'action de ces voies sur la formation de l'axe antéro-postérieur est médiée par ces facteurs de transcription (Bel-Vialar et al., 2002; Ikeya and Takada, 2001; Pilon et al., 2007, 2006; Shimizu et al., 2005).

Une fois traduites, les protéines *cdx* régulent en retour positivement l'expression de *Wnt* et de *Fgf*, permettant le maintien de leur expression dans la partie caudale de l'embryon tout au long de la formation de la moelle épinière (Savory et al., 2009; van den Akker et al., 2002; van Rooijen et al., 2012; Young et al., 2009). Des études récentes de l'interaction de *Cdx2* avec le génome ont pu mettre en évidence que *Cdx* cible directement des acteurs de la voie WNT et FGF (Amin et al., 2016). Ainsi, les voies de signalisation WNT, FGF et les gènes *Cdx* coopèrent dans une boucle de rétroaction positive pour initier et maintenir l'élongation. De ce fait, *Cdx2* est un marqueur essentiel de la spécification de la moelle épinière.



**Figure 13 : Domaine d'expression des molécules Wnt et FGF et des facteurs de transcription impliqués dans la formation du tronc par élongation.**

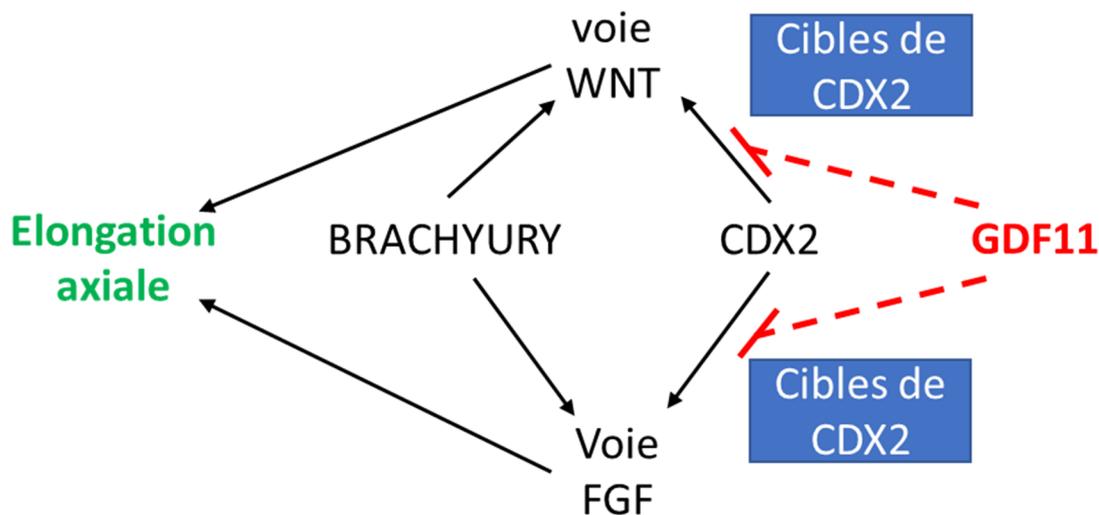
(A) Représentation schématique de la région caudale de l'embryon de souris au stade E8.5. La ligne primitive est représentée par une ligne verticale noire et le nœud primitif est représenté par un point noir en position antérieure de la ligne primitive. La localisation de la zone souche contenant les cellules hautement prolifératives à l'origine de l'élongation axiale est définie en rouge. Les cellules sortant de cette zone vont donner les tissus neuronaux et mésodermiques du tronc. Les représentations localisées en bas du schéma représentent la coupe transversale de l'embryon au niveau de la partie antérieure de la ligne primitive (Zone en pointillé). Les trois feuilletts embryonnaires sont représentés, le feuillet supérieur est l'épiblaste et le second feuillet représente l'endoderme. (B) Représentation schématique de la boucle d'autorégulation de l'expression des facteurs WNT, FGF, CDX et BRACHYURY dans le domaine caudal de l'embryon en formation.

(Modifié d'après Neijts et al., 2014)

## ii. *Brachyury*

De manière similaire à l'activité de *Cdx*, le gène codant pour la protéine *Brachyury* est nécessaire lui aussi à l'élongation du tronc (Ciruna and Rossant, 2001; Yamaguchi et al., 1999). Les souris déficientes pour le gène *Brachyury* présentent de sévères défauts de formation du tronc puisqu'elles ne forment pas plus de sept paires de somites. *Brachyury* est exprimé dans la ligne primitive dès le début de sa formation, puis il est exprimé dans le nœud primitif, la notochorde et dans le bourgeon caudal (Olivera-Martinez et al., 2012; Satoh and Jeffery, 1995; Wymeersch et al., 2016) Plusieurs gènes impliqués dans l'élongation axiale et dans la migration cellulaire sont des cibles directes de *Brachyury*. Parmi celles-ci, on trouve les gènes *Wnt3a* et *Fgf8* dont l'expression est perdue dans les souris déficientes pour *Brachyury* (Amin et al., 2016; Evans et al., 2012). Ces données suggèrent l'existence d'un rétrocontrôle positif de *Brachyury* sur l'expression de *Wnt3a* et *Fgf8* tout comme *Cdx2* (Amin et al., 2016; Dunty et al., 2008; Martin and Kimelman, 2010; Yamaguchi et al., 1999). En outre, *Brachyury* participe à l'expression du gène codant pour la protéine Cytochrome P450 Family 26 Subfamily A Member 1 (*Cyp26a1*), une enzyme dégradant l'acide rétinoïque qui « protège » les cellules de la région caudale de l'AR qui lui, induit la différenciation neurale (voir plus bas) et favorise la fin de l'élongation (Martin and Kimelman, 2010; Rhinn and Dolle, 2012).

La terminaison de l'élongation axiale, se passe par la perte de ces réseaux WNT, FGF Cdx2, Brachyury. Lors des derniers stades de l'élongation, les cellules du bourgeon caudal expriment une molécule appartenant à la famille TFG- $\beta$  : le Facteur de Croissance et de Différenciation 11 (GDF11) (Gamer et al., 1999). Le GDF11 exprimé dans le bourgeon caudal participe au développement de la fin de la moelle épinière (Lee et al., 2010; Liu, 2006). Son action semble passer en partie par la régulation positive de la voie AR qui possèdent une action antagoniste à la voie FGF, mais surtout, il permet la répression de l'activité Wnt et Fgf en interférant avec l'activité de Cdx2 (Amin et al., 2016; del Corral and Storey, 2004; Denans et al., 2015) (Figure 14).



**Figure 14 : Schéma modèle de l'arrêt de l'élongation de la partie caudale du corps par GDF11.**

Le maintien des voies WNT et FGF en partie par BRACHYURY et CDX2 permet l'élongation axiale. Mais lors de l'expression de GDF11 dans les stades terminaux de l'élongation, GDF11 perturbe indirectement l'activité de CDX2. La répression de WNT et FGF ainsi induit l'arrêt de l'élongation. (Modifié d'après Amin et al., 2016)

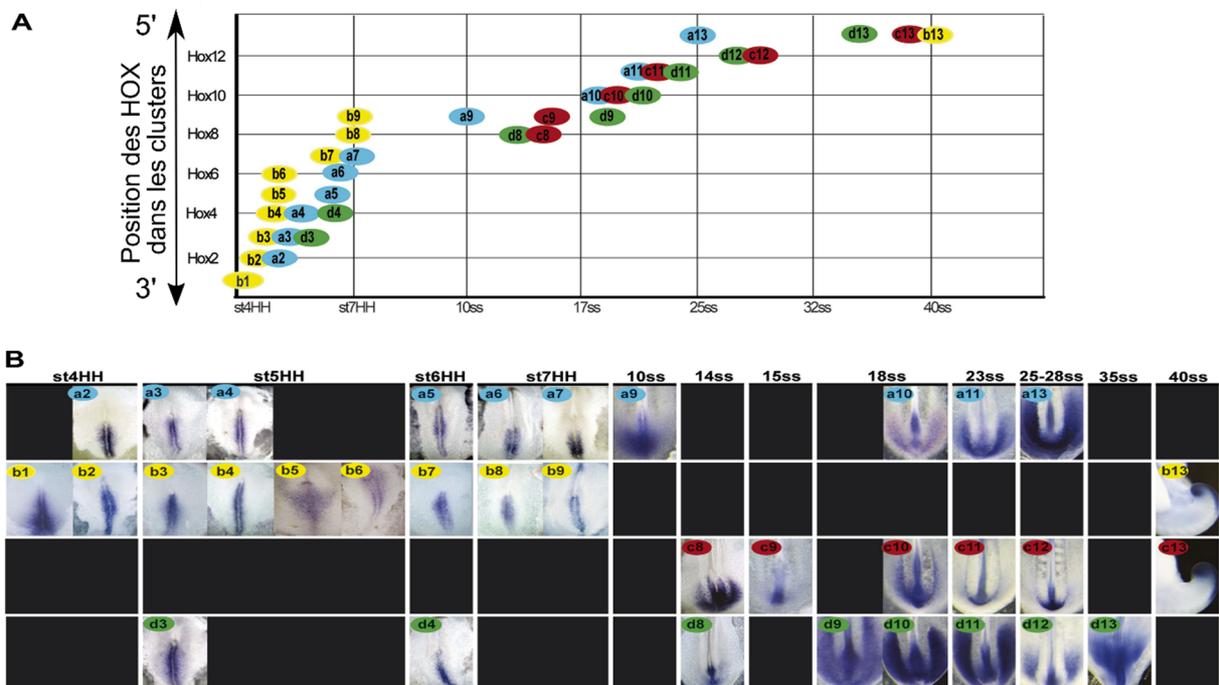
En résumé, les voies WNT, FGF et Notch avec les facteurs de transcription *Brachyury* et *Cdx* sont donc impliquées dans l'élongation axiale de l'embryon incluant la moelle épinière. Cette élongation passe par ces facteurs en agissant sur les cellules progénitrices de la région caudale (Figure 14). Or au cours de l'élongation, c'est au sein de cette région que l'expression des gènes *Hox* est induite. Les voies Wnt, FGF et le facteur de transcription *Cdx2* jouent un rôle essentiel dans ce processus assurant le couplage de l'élongation et de l'activation des gènes *Hox*.

## 2. L'induction temporelle des gènes *Hox* préfigure leur domaine d'expression dans la moelle épinière

Lors de l'élongation de la moelle épinière, l'induction de l'expression des gènes *Hox* se passe progressivement au cours du temps et est contrôlée par plusieurs voies de signalisation dont les voies WNT, FGF, GDF11 et le facteur de transcription Cdx2.

### a) Induction temporelle des gènes *Hox* lors de l'élongation

Il a été montré que l'initiation de la transcription des gènes *Hox* dans l'embryon de poulet s'observe à partir du stade 4hh (=18/19 heures après la fertilisation) et au stade E7.2 chez la souris au niveau des cellules de la partie caudale de l'embryon (Dasen et al., 2005; Neijts et al., 2016). L'expression des gènes *HoxB* s'initie pour les gènes en 3' du complexe dans la ligne primitive (Deschamps and Wijgerde, 1993; Forlani et al., 2003; Gaunt and Strachan, 1996). Les gènes en 5' et ceux des autres complexes apparaissent plus tard dans la région caudale de l'embryon selon une colinéarité temporelle. Les gènes en 3' des complexes étant exprimés les plus tôt suivis de l'activation de ceux situés plus en 5' des complexes. Ainsi on observe une corrélation entre l'arrangement des gènes *Hox* au sein de leur clusters et leur ordre d'expression durant l'embryogenèse (Figure 15) (Carpenter, 2002; Denans et al., 2015; Forlani et al., 2003; Gaunt and Strachan, 1996; Liu, 2006).

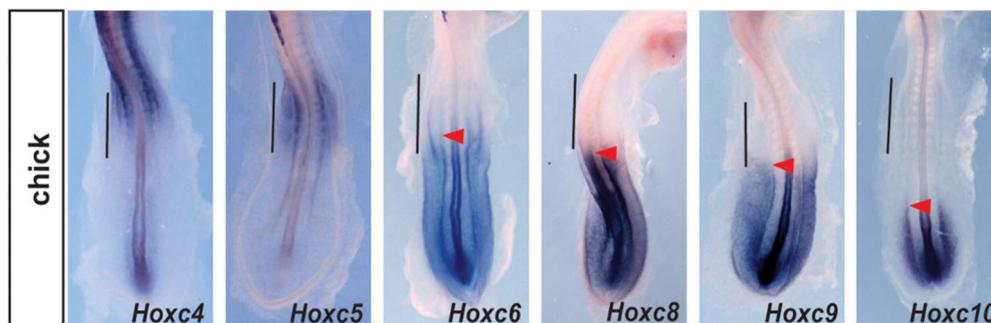


**Figure 15 : Activation des gènes *Hox* dans le bourgeon caudal selon une colinéarité temporelle.**

(A) Tableau résumant les stades d'initiation d'expression des différents gènes *Hox* dans la région caudale de l'embryon. L'initiation de l'expression des gènes *Hox* se fait de manière séquentielle au cours du temps en accord avec leur position dans le cluster.

(B) Représentation des hybridations *in situ* ciblant les gènes *Hox* des différents clusters (A : bleu, B : jaune, C : rouge, D : vert). L'initiation de leur expression se met en place au niveau de la partie caudale de l'embryon. (Modifié d'après Denans et al., 2015)

L'expression progressive et temporelle des gènes *Hox* dans la partie caudale de l'embryon est donc associée à la différenciation progressive de ces cellules pour former l'axe rostro-caudal de la moelle. La coïncidence de ces deux évènements a été proposée comme expliquant la mise en place des domaines spatiaux des *Hox* le long de l'axe R-C. Ainsi, comme on peut le voir par hybridation *in situ* lors de l'élongation axiale chez le poulet, les gènes *Hox* positionnés en 3' sont exprimés dès les régions antérieures de l'axe, tandis que les gènes en position 5' sont exprimés dans les domaines de plus en plus caudaux (Nishimoto et al., 2014) (Figure 15). On observe donc une corrélation de l'ordre d'induction des *Hox* au cours du temps avec leur domaine d'expression le long de l'axe R-C. Ces résultats ont amené à proposer un lien direct entre la colinéarité temporelle et spatiale.



**Figure 16** Domaine d'expression des gènes *Hox* le long de la partie caudale du corps en formation. Hybridation *in situ* sur des embryons de poulet au stade de 20-22 somites. Les gènes *Hox* 3' induits précocement dans la partie caudale de l'embryon sont exprimés dans la partie antérieure de la moelle, née dans les premiers stades de développement. Les gènes *Hox* plus localisés en 5' sont exprimés à des stades plus tardifs et leur expression se limite aux zones caudales de l'embryon. (Modifié d'après Nishimoto et al., 2014)

Ainsi, ces résultats montrent que la mise en place des domaines d'expression des gènes *Hox* le long de l'axe R-C est initiée au cours de l'élongation axiale dans les cellules localisées dans le bourgeon caudal qui nourrissent aussi l'élongation axiale (Forlani et al., 2003).

A partir de ce constat, des études développementales ont essayé de déterminer si des mécanismes moléculaires impliqués dans l'élongation pouvaient participer à l'initiation de l'expression des *Hox*. Il a ainsi été mis en évidence que la voie Wnt, FGF puis dans un second temps GDF11 sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes *Hox*.

#### b) [L'expression des gènes \*Hox\* est induite par les voies WNT, FGF et GDF11](#)

Les morphogènes WNT/FGF/AR et GDF11 participent à la régulation de l'expression des gènes *Hox* (J. P. Liu et al., 2001; Liu, 2006; Metzis et al., 2018; Nordström et al., 2006; Philippidou and Dasen, 2013). Leurs rôles dans le contrôle de l'expression des *Hox* ont été étudiés par suractivation ou inhibition de ces voies.

i. *Voie WNT dans l'induction des gènes HOX*

Le signal WNT au cours de la gastrulation précède l'initiation de l'expression des gènes *HoxB* 3' au niveau de la ligne primitive. Les progéniteurs spinaux de souris *Wnt3a*<sup>-/-</sup> n'expriment pas les gènes *Hox* démontrant que l'activité précoce de Wnt est nécessaire et passe en partie par l'interaction entre les facteurs de transcription activés par la voie WNT avec des sites enhancers localisés en 3' des clusters HOX (Liu et al., 1999; Neijts et al., 2016). De plus, le rôle de *Wnt* dans l'induction d'expression des gènes *Hox* a été confirmée dans les embryons en pré-gastrulation. Ces embryons exposés précocement à un agoniste (la molécule chiron) de la voie canonique de WNT induisent précocement les gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* (Neijts et al., 2016). De plus, l'augmentation progressive de *Wnt3a* lors de l'élongation axiale s'accompagne d'une expression progressive des gènes *Hox* en position 5'. Il a été montré que l'initiation de la transcription des gènes *Hox* spinaux passe par l'activité synergique de la voie WNT et FGF qui induisent l'expression du facteur de transcription *Cdx2* qui est essentiel pour l'activation des gènes *Hox* du milieu et de la partie 5' des complexes (Ikeya and Takada, 2001; Pilon et al., 2006).

ii. *FGF et GDF11 et induction des gènes Hox*

FGF est impliqué dans l'élongation axiale et le maintien de la zone des cellules souches localisées dans la région caudale de l'embryon. De plus, des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'augmentation de l'activité FGF amène à un shift antérieur de l'expression des gènes *Hox* caudaux et à la spécification de MNs d'identité plus caudale (Bel-Vialar et al., 2002; J. P. Liu et al., 2001). Aussi, l'exposition d'explants à des concentrations croissantes de FGF induit des MNs exprimant des *Hox* de plus en plus caudaux suggérant un effet concentration dépendant de cette molécule sur la régulation des *Hox* mais ni l'impact transcriptionnel sur l'expression des gènes *Hox* ni les mécanismes n'ont été déterminés (Dasen et al., 2003; J. P. Liu et al., 2001). Cependant, ces résultats ont conduit à proposer un modèle dans lequel plus les cellules caudales de l'embryon restent dans la zone proliférative plus elles sont exposées longtemps au FGF ou alors à une augmentation de concentration et donc plus elles activeraient l'expression des gènes *Hox* en 5'. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette interprétation de la durée/concentration de FGF reste inconnus.

GDF11, lui, est exprimé tardivement dans la région caudale de l'embryon (HH10 chez le poulet et E8.5 chez la souris) puis son expression augmente dans le bourgeon caudale (vers E9,5) (J. P. Liu et al., 2001; Nakashima et al., 1999). L'expression de GDF11 est nécessaire à la formation des parties les plus caudales de l'embryon. En effet, les souris mutées pour *Gdf11* présentent une moelle épinière tronquée et une extension de l'expression des gènes *Hox* antérieurs vers une position plus caudale que dans les souris wild-type (McPherron et al., 1999). Il a ainsi été montré qu'une expression ectopique

de Gdf11 dans le tube neural chez le poulet ou la souris induit une antériorisation des domaines d'expression des gènes *Hoxc6-Hoxc10*. A l'inverse, l'inhibition de la voie de signalisation activée par Gdf11 induit un déplacement caudal des domaines d'expression des *Hoxc6-Hoxc10*. L'absence de Gdf11 n'affecte pas le domaine d'expression des *Hox* dans la partie cervicale, l'expansion du domaine d'expression des *Hox* commence au niveau du domaine thoracique, comme observés dans des expériences d'inhibition de la voie GDF11 ou dans des souris délétées en Gdf11. Ainsi, Gdf11 participe à la spécification de l'identité caudale de l'embryon et semble agir sur la spécification des domaines thoracique jusqu'à la fin du tronc. Le maintien de l'expression de *Hoxc6*, *Hoxc8*, *Hoxc9* et *Hoxc10* suggère que Gdf11 n'est pas nécessaire à leurs expressions, et que le FGF endogène est suffisant (J. P. Liu et al., 2001; Liu, 2006).

Comme pour le FGF, les cultures *in vitro* d'explants de plaque neurale de poulet exposés à une concentration croissante de GDF11 expriment des *Hox* correspondant à des domaines de plus en plus caudaux *in vivo*. De plus, dans ces cultures, FGF et GDF11 peuvent agir de manière synergique pour induire l'expression de *Hox* plus caudaux. Ainsi, il est suggéré que l'expression des *Hox* les plus caudaux (*Hox10-Hox13*) dépend de la coactivation de ces deux voies de signalisation (J. P. Liu et al., 2001). L'expression des *Hox* par le Gdf11 passe par l'activation de la voie Smad2/3. En effet la surexpression d'une forme constitutivement active de Smad2 dans les progéniteurs neuronaux suffit à mimer l'effet du Gdf11. La présence dans le génome de sites de fixation des protéines Smad entre les gènes *Hoxc9* et *Hoxc8* suggèrent que les facteurs de transcriptions Smad2/3 activés par le Gdf11 pourrait directement contrôler l'expression des *Hox* en se fixant sur ces sites. Une autre hypothèse propose que la voie Smad2/3 pourrait contribuer à l'expression des gènes *Cdx*, impliqués dans la régulation des gènes *Hox* (Lohnes, 2003).

### iii. *Le rôle de l'acide rétinoïque dans la régulation des HOX*

L'AR possède un rôle dans la régulation de l'expression des gènes *Hox* dans le tronc cérébral et dans la partie la plus rostrale de la moelle épinière (*Hox 1-5*) (Bel-Vialar et al., 2002; J. P. Liu et al., 2001). Des explants du tube neural de poulet donnant normalement naissance à la moelle cervicale ne forment effectivement des motoneurones cervicaux (*Hoxc5+*) qu'une fois exposés à l'AR (J. P. Liu et al., 2001). *In vivo*, cette source d'AR provient des somites et est essentielle pour contrôler l'expression des *Hox* antérieurs (1-5). Cependant l'AR ne semble pas avoir un effet dans l'initiation de l'expression des gènes *Hox* dans la partie caudale de l'embryon qui donne naissance à la moelle épinière depuis les régions brachiales jusque les régions sacrées. En effet, les embryons de souris déficient en RALDH2 (enzyme synthétisant l'AR) peuvent toujours induire l'expression des gènes *Hox* caudaux (Roelen et al., 2002). L'AR a même un effet inhibiteur sur l'induction de ces gènes puisque l'exposition des progéniteurs à l'AR conduit à l'arrêt de l'induction des *Hox* en 5' (del Corral and Storey, 2004).

iv. *Le rôle des gènes Cdx dans la régulation des Hox.*

Bien que ces quatre voies de signalisation soient connues pour contrôler l'expression des *Hox*, les mécanismes intracellulaires, en particulier les voies de signalisation qu'ils induisent pour réguler ces gènes, restent encore mal connus. Cependant, il est clair que le facteur *Cdx2* joue un rôle essentiel dans ce processus (Young and Deschamps, 2009). Or les gènes *cdx* et *Hox* sont très proches. Ils dérivent d'un gène ou d'un cluster de gènes protohox ancien (Pollard and Holland, 2000). Au cours du développement, l'expression des deux familles de gènes est initiée dans la ligne primitive postérieure au stade E7.2 (Young and Deschamps, 2009) en réponse à l'activation de la voie WNT (Neijts et al., 2017). Les embryons de souris mutés pour *Cdx2* présentent une transformation homéotique (décalage des domaines d'expression des gènes *Hox*) le long de l'axe R-C (van den Akker et al., 2002). De plus, la surexpression des gènes *Hoxa5* et *Hoxb8* dans ces embryons *Cdx2* *-/-* est suffisante pour réverter le phénotype d'élongation de l'embryon, suggérant le rôle de *Cdx2* dans la régulation de l'expression des *Hox* (Young et al., 2009). Dans un système *in vitro* issu de cellules souches épiblastiques de souris soumises à une source de Wnt, l'analyse par chip-seq de *Cdx2* a permis de mettre en évidence les gènes *Hox* comme des cibles de *Cdx2* (Mazzoni et al., 2013; Neijts et al., 2016). Les protéines *Cdx* agissent sur la régulation des *hox* en partie en se fixant sur des sites enhanceurs dans les clusters *Hox* 4 à 10 pour induire leur transcription. Cependant, pour permettre la transcription progressive des *Hox* caudaux, l'activité de *Cdx2* est nécessaire mais doit agir en coprésence de la voie FGF (Mazzoni et al., 2013).

Dans l'ensemble, les gènes *Hox* sont induits progressivement dans la région caudale de l'embryon par l'action combinatoire de différentes voies de signalisation activant des facteurs de transcription. Les mécanismes précis entre ces voies et l'activation des gènes restent encore mal définis. Cependant il apparaît de plus en plus clairement que cette activation des *Hox* intervient dans des progéniteurs particuliers, les progéniteurs neuromésodermaux qui sont les progéniteurs donnant naissance à la moelle épinière et au mésoderme paraxial.

### 3. Progéniteurs neuromésodermaux : formation de la moelle épinière et induction des gènes HOX

#### a) La zone souche caudale de l'embryon à l'origine des somites et du tube neural

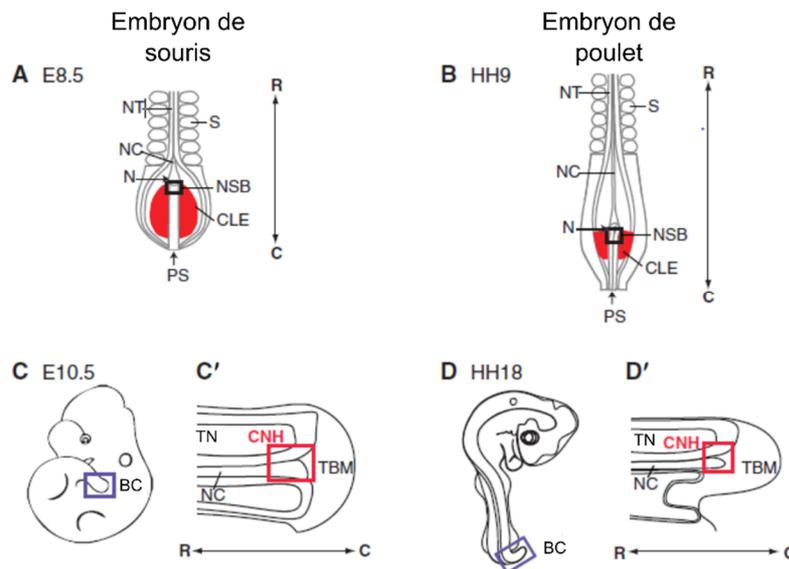
Des expériences de lignage, par marquage de petits groupes de cellules dans les modèles murins et aviaires, ont permis de montrer que plusieurs domaines de la région la plus caudale de l'embryon participent à son élongation tout en donnant naissance à la fois à la plaque neurale et aux

dérivés mésodermiques (Figure 17), en particulier vers E8/8,5 chez la souris (environ jour 19 chez l'humain)

1) Le domaine comprenant la partie caudale du nœud primitif et la partie rostrale de la ligne primitive qui est définie comme la frontière nœud/ligne (NSB).

2) De chaque côté de la ligne primitive, l'épiblaste caudal latéral (ECL).

Les cellules des NSB et ECL semblent donner naissance aux somites et à la moelle épinière jusqu'au segment de la transition thoracique/lombaire (Brown and Storey, 2000; Henrique et al., 2015; Wymeersch et al., 2019). Puis au stade E9,5 chez la souris ou au stade HH14 chez le poulet le domaine de la frontière chordo-neurale (CNH), dérivée du NSB, situé entre la limite du tube neural et de la notochorde néoformée (Figure 17), contient les cellules qui assurent la dernière phase de l'élongation postérieure du corps (formation de la queue) (Cambray and Wilson, 2002; Delfino-Machín et al., 2005; Kondoh and Takemoto, 2012; Olivera-Martinez et al., 2012; Wilson et al., 2009). Cette structure se forme dans le bourgeon caudal après la fermeture du neuropore caudale, un événement ayant lieu au 27<sup>ème</sup> jour dans l'embryon humain (du Plessis and Volpe, 2018). Les expériences de lignage ont permis de montrer que les cellules de ces 3 domaines (NSB, ECL, CNH) ont une capacité d'auto-renouvellement mais aussi peuvent donner naissance à des dérivés à la fois dans la moelle épinière et dans les somites sur plusieurs segments de l'axe rostro-caudal. (Cambray and Wilson, 2002; Forlani et al., 2003; McGrew et al., 2008; Olivera-Martinez et al., 2012; Selleck and Stern, 1991; Tzouanacou et al., 2009).



**Figure 17 : Formation progressive de la moelle épinière par élongation à partir de progéniteurs mésodermiques et neuraux.**

Schématisation des domaines générant les progéniteurs neuromésodermiques chez la souris et le poulet dans les stades précoces (6 somites) (A-B) et tardifs (35 somites) (C-D). Au stade E8.5 et HH9, la ligne primitive (PS), les somites (S), le tube neural (NT) et la notochorde (NC) sont visibles. Les domaines participants à l'élongation de l'axe R-C du corps embryonnaire sont la frontière nœud-ligne (NSB), l'épiblaste caudale latérale (ECL) (A-B). Au cours du développement, le NSB et l'ECL vont donner la frontière chordo-neurale (CNH) localisée au niveau du bourgeon caudal (BC), et en amont du mésoderme du bourgeon caudale (TBM).

(Modifié d'après Wilson et al., 2009)

En revanche ces résultats mettaient en évidence l'existence de régions donnant naissance à la fois à la moelle épinière et aux somites sans montrer si ces régions contiennent différents types de progéniteurs ou des progéniteurs bipotents.

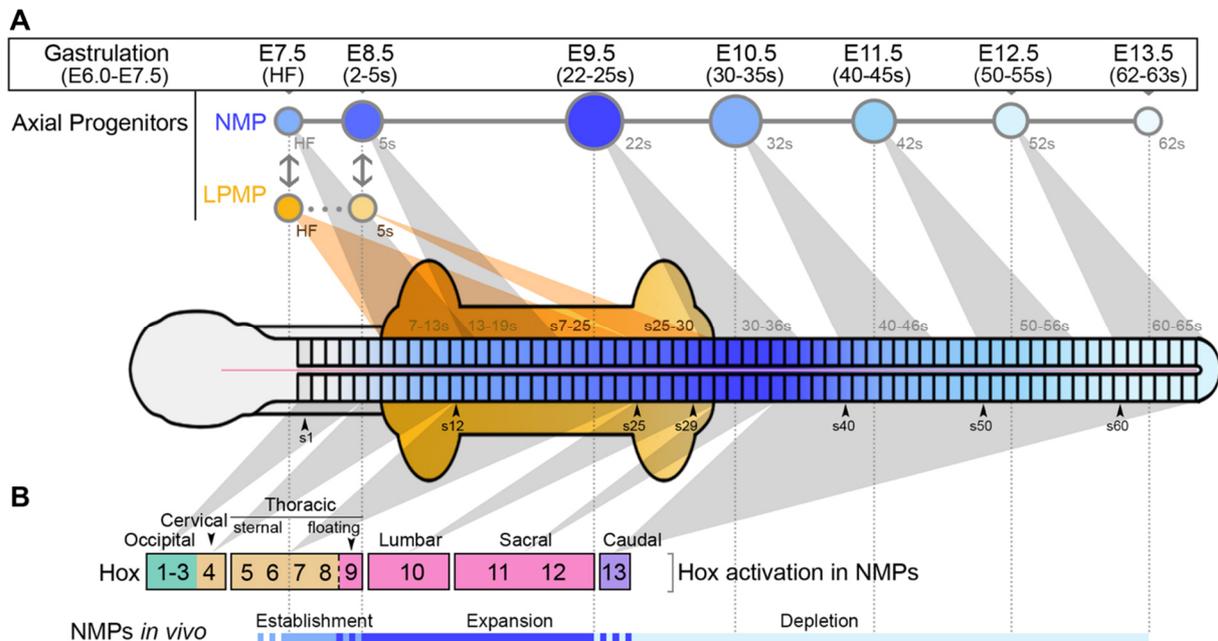
b) [Les progéniteurs neuromésodermaux](#)

Des expériences de traçage rétrospectif du lignage de cellules uniques (par la réversion spontanée du gène *laacZ* en gène fonctionnel *lacZ*) ont donc été réalisées dans la région caudale proliférative de l'embryon de souris afin de déterminer le destin des cellules progénitrices présentes dans cette région (Tzouanacou et al., 2009). Ces expériences ont mis en évidence la présence de clones donnant naissance à des cellules filles à la fois dans le mésoderme paraxial et dans la moelle épinière (Tzouanacou et al., 2009). Ces résultats montrent dans cette région caudale de l'embryon la présence de progéniteurs s'autorenouvelant, bipotents car donnant naissance à la fois à la moelle épinière et aux somites. Ces progéniteurs neuromésodermaux sont capables de donner naissance à des clones s'étendant sur plusieurs segments de la moelle épinière ou des somites le long de l'axe rostro-caudale montrant qu'ils ont une activité de progéniteurs axiaux capables de nourrir l'élongation des tissus. Les PNMs sont donc capables de s'autorenouveler et de participer à la formation de dérivés sur l'ensemble de l'axe pour les plus précoces ou des portions de l'axe de plus en plus caudale pour les PNMs plus tardifs.

En accord avec cette bipotentialité ces cellules coexpriment Sox2 un marqueur du lignage neural et Brachyury qui est exprimé dans le lignage mésodermique et nécessaire à sa formation (Garriock et al., 2015; Rivera-Pérez and Magnuson, 2005; Takemoto, 2005). Ces cellules doublement positives sont également retrouvées dans la région caudale des embryons humains (Martin and Kimelman, 2012; Olivera-Martinez et al., 2012). Cependant dans l'épiblaste caudal latéral murin toutes les PNMS n'expriment pas ces deux marqueurs au même niveau et ceci corrèle avec des destins biaisés des cellules progénitrices. En effet des expériences de greffes chez le poulet ont permis de montrer que les cellules les plus latérales exprimant plus Sox2 que Brachyury ont tendance à adopter un destin neural tandis que les cellules plus caudales et plus médianes dans l'épiblaste caudale expriment un niveau plus élevé de Brachyury et moins de Sox2 et ont tendance à donner naissance à des clones colonisant le mésoderme paraxial (Wymeersch et al., 2016) (Figure 18).



une activation des *Hox* 5-8 autour du stade E7.5 et une induction de l'expression des *Hox*9-12 entre le stade E8.5 et E9.5 (Figure 19) (Gouti et al., 2017; Wymeersch et al., 2019). Les cellules du nœud qui contrôlent le renouvellement des PNM en revanche n'expriment pas les gènes *Hox*. Ces résultats suggèrent que l'expression des *Hox* s'initie dans les PNM. L'induction progressive des gènes *Hox* selon une colinéarité temporelle permet aux PNM en vieillissant d'acquérir l'expression de plus en plus de gènes HOX situé en 5' des complexes et exprimés plus caudalement dans l'embryon (Figure 19).



**Figure 19 : Représentation de l'évolution du profil *Hox* dans les progéniteurs neuromésodermes au cours du développement de la souris.**

(A) Le changement de couleur représente le changement de profil transcriptionnel des cellules, bleu pour les progéniteurs neuromésodermes (NMPs), orange pour les progéniteurs du mésoderme latéral/paraxial (LPMPs). Les doubles flèches indiquent l'interaction entre les NMP et les LPMP. (B) Activation des *Hox* au cours du temps dans les NMP et les zones qui les expriment. Le code couleur des *Hox* fait référence à une définition des *Hox* paralogues comme de la partie rostrale (vert), centrale (beige), caudale (rose) et terminale (violet). (Modifié d'après Wymeersch et al., 2016)

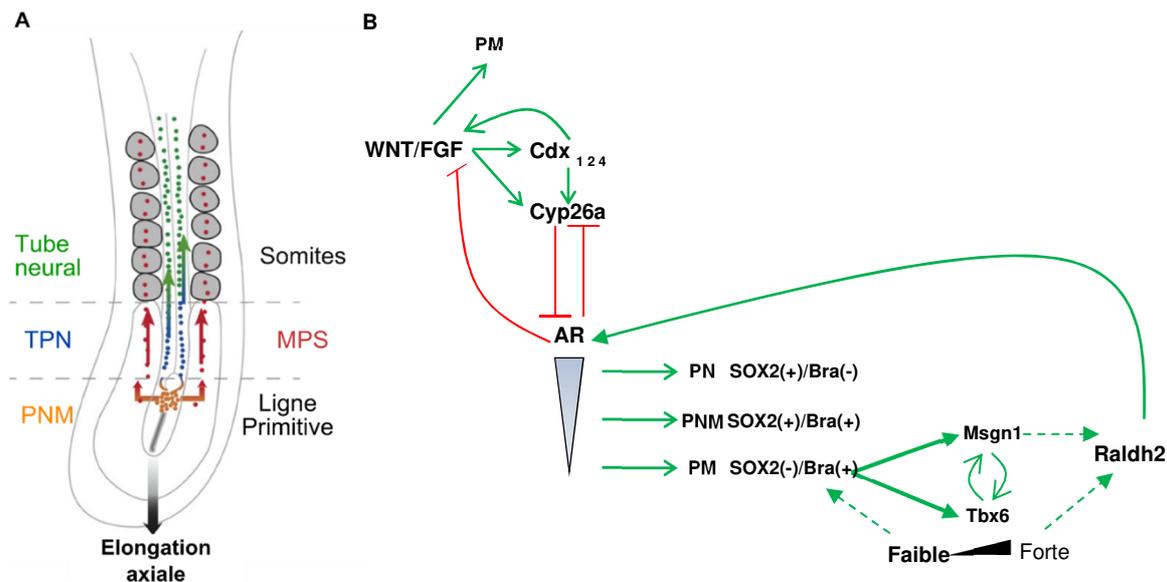
Dans l'ensemble, ces résultats montrent que des cellules progénitrices ayant des propriétés de cellules souches sont présentes dans la partie caudale de l'embryon et nourrissent l'élongation axiale en donnant naissance à des descendants peuplant l'axe rostro-caudal. Certaines régions de cette partie de l'embryon contiennent des progéniteurs neuromésodermes qui donnent naissance à la fois aux somites et à la moelle épinière. La spécification de ces cellules et leur maintien est donc essentielle à la formation de la moelle épinière durant l'élongation axiale et donc à la formation des différents sous types de MNs. Les progéniteurs neuromésodermes semblent donc être le site d'activation temporelle des *Hox* (Figure 19). Cependant, les mécanismes contrôlant l'activation progressive des *Hox* dans ces cellules restent inconnus

### c) Différenciation des progéniteurs neuromésodermaux vers le lignage neural

Les cellules PNM vont se différencier pour donner naissance à la moelle épinière et au mésoderme paraxiale. Lorsque les PNM débutent leur engagement vers l'un de ces destins, ils migrent premièrement dans une zone de transition : Le mésoderme pré-somitique (MPS) ou le tube préneural (TPN) (Gouti et al., 2015) (Figure 20 A). Les voies WNT/FGF jouent un rôle clé dans la formation du mésoderme et l'acide rétinoïque dans la spécification neuronale.

Le maintien de l'activité WNT, FGF et les protéines CDX, BRACHURY permettent l'engagement vers le mésoderme traduit par l'augmentation de l'expression du gène *Tbx6* puis le gène *Msn1* (Gouti et al., 2014; Takemoto et al., 2011; Yamaguchi et al., 1999). Ces deux gènes sont caractéristiques des populations PNM engagés vers le mésoderme pré-somitique (Chalamalasetty et al., 2014; Chapman and Papaioannou, 1998). Cette différenciation passe par la répression des gènes exprimés dans les PNM associés à l'identité neurale (*Sox2+*) (Takemoto et al., 2011). *Tbx6* et *Msn1* par boucle d'autorégulation vont amplifier leur expression dans les cellules du mésoderme présomitique et induire la différenciation en cellules somitiques (Gouti et al., 2017; Kondoh and Takemoto, 2012; Takemoto et al., 2011). Les somites nouvellement formés sécrètent de l'AR qui lui va stimuler la différenciation de certains PNM en progéniteurs neuraux. En effet l'AR conduit à une augmentation de l'expression de *SOX2*, une répression de la voie FGF qui permet l'auto-renouvellement des progéniteurs, ainsi que *Brachyury* et de *Tbx6*, gènes associés au destin mésodermique (Figure 20,B) (Del Corral et al., 2003a; Delfino-Machín et al., 2005; Iulianella et al., 1999; Kumar and Duester, 2014; Shum et al., 1999).

Dans le cas d'une spécification vers le destin neuronal, les PNM migrent vers le domaine caudal de la plaque neurale définie comme la zone pré-neural (TPN) (Diez del Corral et al., 2002) (Figure 20,A) . Ces cellules ont une identité moléculaire faisant le pont entre les cellules d'identité PNM et les cellules neurales. L'exemple le plus frappant est la perte de l'expression de *Brachyury* (exprimé dans les PNM) lors du passage des cellules PNM vers les cellules du TPN , mais le maintien de l'expression du gène *Nkx1.2* (exprimé dans les PNM et perdu dans les progéniteurs neuronaux) (Delfino-Machín et al., 2005). Les cellules du tube préneural sont toujours exposées au FGF qui agit sur les cellules pour maintenir la prolifération des progéniteurs (Lunn et al., 2007) et limite la spécification des progéniteurs vers le destin neuronal en réprimant l'expression des gènes *Pax6* et *Irx3*. Cette répression passe indirectement par le maintien de l'expression de *Nkx1.2* par le FGF. Cependant, l'absence de phénotype grave dans les souris mutantes pour *NKX1.2* suggère que le FGF agit également par l'intermédiaire d'autres facteurs cibles (Delfino-Machín et al., 2005; Simon and Lufkin, 2003).



**Figure 20 : Régulation du destin neuromésodermal au cours de l'élongation de la moelle épinière.**

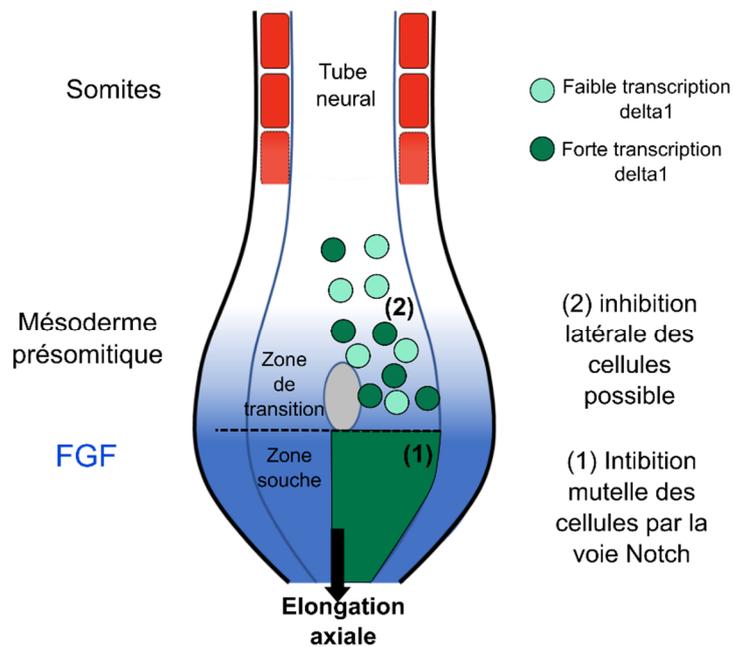
(A) Les PNM sortent du pool de cellules pour s'engager soit vers le destin mésodermal ou le destin neural. Sous l'effet de la diminution de la voie FGF et l'exposition à la voie AR, les PNM vont progressivement s'engager vers le destin neural en formant les progéniteurs du tube pré-neural, puis se différencient en progéniteurs neuronaux. (B) La régulation du destin des progéniteurs neuro-mésodermes (PNM) dépend de l'exposition aux signaux de la voie WNT et FGF pour donner les progéniteurs mésodermiques (PM). En parallèle, l'induction de RALDH2 par les cellules du mésoderme induit une augmentation d'AR, agissant sur les PNM proches pour inhiber l'activité de WNT/FGF et promouvoir le destin des progéniteurs neuronaux (PN). L'équilibre entre les voies WNT/FGF et AR permet le maintien des PNM.

PM = prémésoderme, Bra = Brachyury, PN = progéniteurs neuronaux, PNM = progéniteurs neuro-mésodermes

(Modifié d'après Gouti et al., 2015)

La transition des cellules de la zone pré-neurale vers le tube neural est induite par l'exposition à l'AR sécrété par les somites. En effet, l'AR inhibe la voie FGF, notamment en se fixant sur les éléments régulateurs du gène *Fgf8* (del Corral et al., 2003; Kumar and Duester, 2014). Cette inhibition de la voie FGF par l'AR induit une perte d'expression de *Nkx1.2* ainsi que l'induction de l'expression des gènes *Pax6* et *Irx3* (del Corral et al., 2003). Des études de gain et de perte de fonction pour les gènes *Pax6* ou *Ngn2* ont montré leur rôle dans la formation de la différenciation neuronale. Lors de l'expression de *Pax6*, les cellules progénitrices conservent une forte activité de prolifération cellulaire, et au cours du temps *pax6* permet l'induction progressive *Ngn2*, un facteur directement impliqué dans la neurogenèse. A partir d'un certain niveau d'induction de *Ngn2*, ce dernier par rétrocontrôle réprime l'expression de *Pax6* et induit l'expression de facteurs impliqués dans la neurogenèse tel que les *NeuroM*. La répression de *Pax6* est donc nécessaire à la neurogenèse. Ce décalage semble être nécessaire pour assurer la sortie des cellules du cycle cellulaire avant leur spécification vers la neurogenèse. (Bel-Vialar et al., 2007). En parallèle, FGF est impliqué dans l'expression de *Delta1* de la voie Notch. La diminution de *Fgf8* par l'AR entraîne une diminution d'expression de *Delta1* à la surface des cellules engagées vers le destin neuronal. Cette diminution d'expression de *Delta1* induit une inhibition latérale de la voie Notch par les cellules et participe aussi à la spécification des cellules progénitrices vers le destin neural (Akai, 2005) (fig 21).

Par la suite, les progéniteurs engagés dans le destin neural forment le tube neural et vont être soumis à plusieurs signaux extrinsèques, dont l'AR et le Sonic Hedgehog (Shh), FGF, WNT ou encore les BMPs qui vont définir les différents domaines de progéniteurs sur l'axe dorso-ventral.

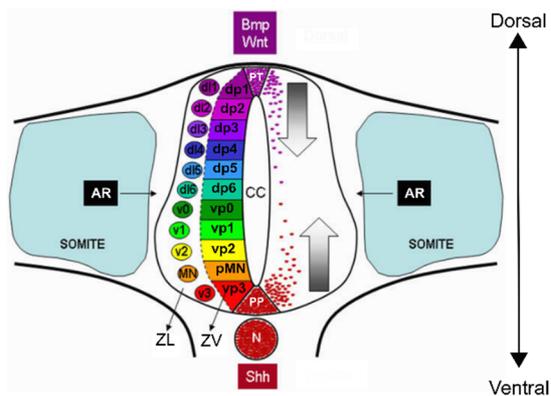


**Figure 21 : Implication de la voie Notch vers le destin neuronal.**

Lors de l'engagement des cellules vers le destin neuronal et la sortie de la zone souche, la diminution de la signalisation FGF induit une diminution de l'expression de delta1 dans les cellules. L'expression de delta1 à ce moment est inégale entre les cellules. Cela permet aux cellules d'activer la voie Notch par inhibition latérale. Les cellules peuvent sortir du cycle cellulaire et s'orienter vers le destin neuronal. (Modifié d'après Gouti et al., 2025 et Akai et al., 2005)

#### 4. Formation de l'axe dorso-ventral du tube neural : induction des domaines de progéniteurs neuraux

La formation de la diversité neuronale dans la moelle épinière est dépendante de la formation de domaines de progéniteurs distincts selon l'axe R-C et D-V. Sur l'axe D-V, 11 domaines de progéniteurs distincts ont été identifiés (Figure 22). 6 groupes dorsaux et 5 ventraux incluant les progéniteurs de motoneurones (Wilson and Maden, 2005). Les progéniteurs associés directement au contrôle moteur sont générés dans la partie ventrale de la moelle épinière tandis que les progéniteurs associés aux activités sensorielles sont localisés dans la partie dorsale. Le destin des progéniteurs spinaux est induit par l'activité de molécules extrinsèques sécrétées le long de l'axe D-V par les structures adjacentes (Figure 18) : Sonic Hedgehog est sécrété par la notochorde et la plaque du plancher, l'acide rétinoïque par le mésoderme paraxial et les somites, les molécule de la voie BMP et de la voie WNT sont sécrétées par la plaque du toit (Lee et al., 2000; Tanabe and Jessell, 1996). Selon les signaux, ils peuvent agir par compétition ou par coopération pour spécifier les différents domaines dorso-ventraux.



**Figure 22 : Formation des différents domaines dorso-ventraux de la moelle épinière.**

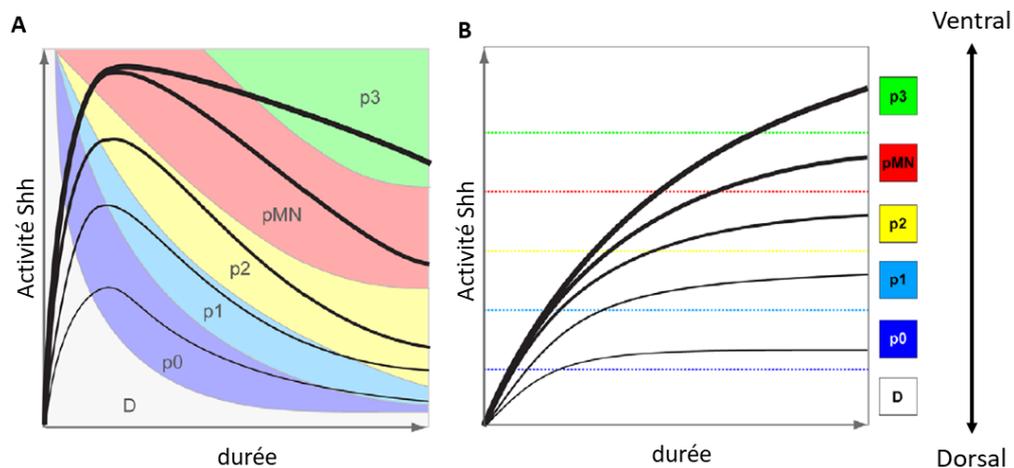
Les centres de signalisation inductifs transmettent des signaux au tube neural pour spécifier les différents types de neurones le long de l'axe D-V. Shh est sécrété par la notochorde (N) et la plaque du plancher (PN) pour modeler la partie ventrale de la moelle épinière. Bmps and Wnts sont exprimés par le plancher du toit (PT) pour former la partie dorsale de la moelle épinière. L'AR est sécrété par les somites du paraxial mésoderme pour spécifier le niveau axial et pour promouvoir la différenciation neuronale. Le canal central (CC) est entouré d'une couche de cellules progénitrices en prolifération dans la zone ventriculaire (ZV). Selon leur position, ces cellules en réponse aux facteurs de croissances se différencient en progéniteurs spécifiques de l'axe D-V. Lors de la sortie du cycle cellulaire les progéniteurs se différencient en neurones et migrent vers la zone latérale de la moelle épinière (ZL). (Modifié d'après Ulloa et al., 2010)

#### a) La régionalisation dorsale du tube neural

La spécification des progéniteurs du domaine dorsal est initiée par les facteurs de la voie BMP et de la WNT. En effet, les cellules de la plaque du toit sécrètent plusieurs protéines de la famille BMP: Bmp6,7 et Gdf7 ont été identifiés chez la souris alors que chez le poulet on trouve Bmp4,5,7 et 9 (Lee et al., 2000; Liem et al., 1997). Des expériences de perte ou gain de fonction (Andrews et al., 2017; Chesnutt et al., 2004; Lee et al., 2000; Panchision et al., 2001; Wine-Lee et al., 2004) d'activité de la signalisation BMP ont mis en évidence la nécessité de cette voie dans la spécification *in vivo* des progéniteurs neuronaux dorsaux de la moelle épinière. Wnt1 et Wnt3a sont des molécules également sécrétées par le plancher du toit et sont impliquées dans la spécification des neurones dorsaux de la moelle épinière (Alvarez-Medina et al., 2008; Muroyama et al., 2002). De plus, il a été observé que la voie canonique  $\beta$ -caténine activée par Wnt1 et Wnt3a régule positivement l'expression de *Gli3*, qui réprime l'activité de la signalisation induite par Shh (Abbasi, 2007; Alvarez-Medina et al., 2008). Dans un second temps, cette voie participe également à la spécification D-V des progéniteurs du tube neural via la répression de l'activité de Shh sécrétée par la notochorde et la plaque du plancher et connue pour être impliquée dans la spécification des progéniteurs des domaines ventraux.

## b) La régionalisation ventrale du tube neural

Shh est une glycoprotéine (Briscoe et al., 2001), sécrétée par la notochorde et le plancher neural, qui diffuse le long de l'axe D-V du tube neural (Ericson et al., 1996) et joue un rôle central dans la spécification des domaines de progéniteurs ventraux. Son rôle dans la régionalisation ventrale du tube neural a été démontré par invalidation du gène *Shh* ou par gain de fonction (Chiang, 1996; Martí et al., 1995; Roelink et al., 1994; Sasai et al., 2014). L'exposition d'explants de plaque neurale soit à des concentrations croissantes, soit pour des durées plus longues à Shh conduit à la spécification de progéniteurs correspondant à des domaines de plus en plus ventraux (du domaine V2 à la formation de la plaque du plancher) lorsque la concentration ou la durée d'exposition croît (Figure 23)(Dessaud et al., 2010, 2007; Ericson et al., 1997; Roelink et al., 1995). Ces expériences ont montré un rôle essentiel de Shh pour la spécification D-V des progéniteurs spinaux.



**Figure 23: Régionalisation dorso-ventrale des progéniteurs du tube neural selon le gradient d'activité de Sonic hedgehog.**

(A) Modélisation de la formation des différents domaines ventraux de la moelle épinière en réponse au SHH selon l'activité de la signalisation de la voie Shh (axe des ordonnées) et la durée d'exposition des cellules au Shh (axe des abscisses). Les zones de couleur représentent les différents domaines ventraux et les tracés noirs représentent le niveau d'activité de la voie de signalisation Shh. La diminution de l'activité Shh est dû à la mise en place d'un rétro-control de la voie.

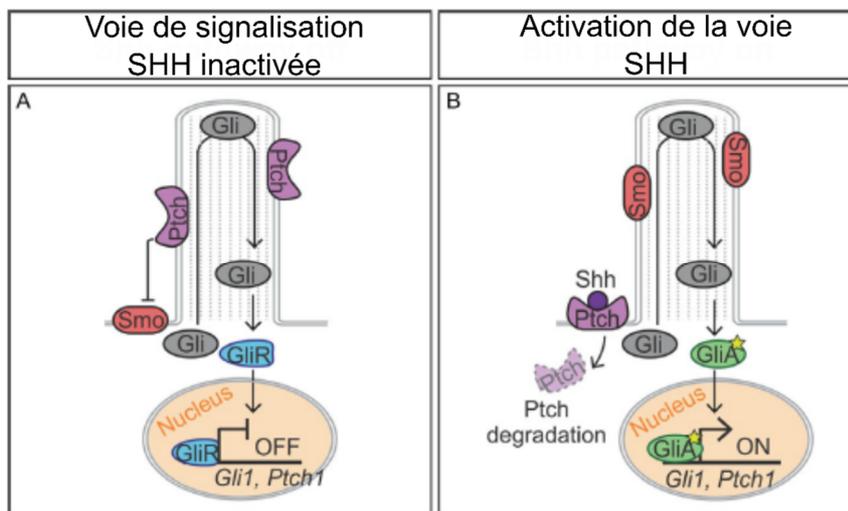
(B) Représentation de l'intégration par les cellules spinales du signal induit par Shh. Bien que l'activité de la voie de signalisation Shh diminue, son intégration au cours du temps permet la spécification des domaines ventraux.

(Adapté d'après Dessaud et al., 2010)

La transduction du signal induit par Shh dans la régionalisation D-V du tube neural aboutit à l'expression du facteur de transcription Gli. Les cellules du tube neural intègrent le signal Shh par l'expression transmembranaire de son récepteur Patched (Ptch). En présence de Shh, l'interaction avec son récepteur conduit à la dérégulation du récepteur smoothened (smo) qui réprime ensuite la dégradation partielle de la protéine Gli (GLI-Kruppel family member GLI, comprenant Gli1,2 et 3). Les protéines Gli non dégradées (GliA) activent l'expression de gènes cibles tandis que les protéine Gli partiellement dégradées (GliR) agissent en tant que répresseur de la transcription (Stamatakis et al.,

2005). Tout le long de l'axe D-V du tube neural, le gradient de Shh est transduit dans les cellules par un équilibre entre la formation de GliA et de GliR, où la quantité de GliA est élevée dans la partie ventrale du tube neural et GliR est élevée dans la partie dorsale. L'équilibre de ces facteurs de transcription dans les progéniteurs le long de l'axe D-V du tube neural est essentiel pour l'acquisition de l'identité des progéniteurs (Figure 24). GliA va gouverner la spécification des progéniteurs selon l'activation et la répression de la transcription de facteurs de transcription à HD, répartis en deux classes :

- Les Facteurs de classe I, dont l'expression est réprimée par le Shh (Pax6, Pax7, Developing brain homeobox 1,2 (Dbx1, Dbx2) et Iroquois Homeobox 3 (Irx3))
- Les Facteurs de classe 2, induits par Shh (Nkx6.1, Nkx2.2, Nkx2.9, Oligodendrocyte factor 2 (Olig2)) (Andrews et al., 2019; Briscoe et al., 2000)



**Figure 24 : Voies de signalisation induites par Shh dans la régionalisation dorso-ventrale du tube neural.**

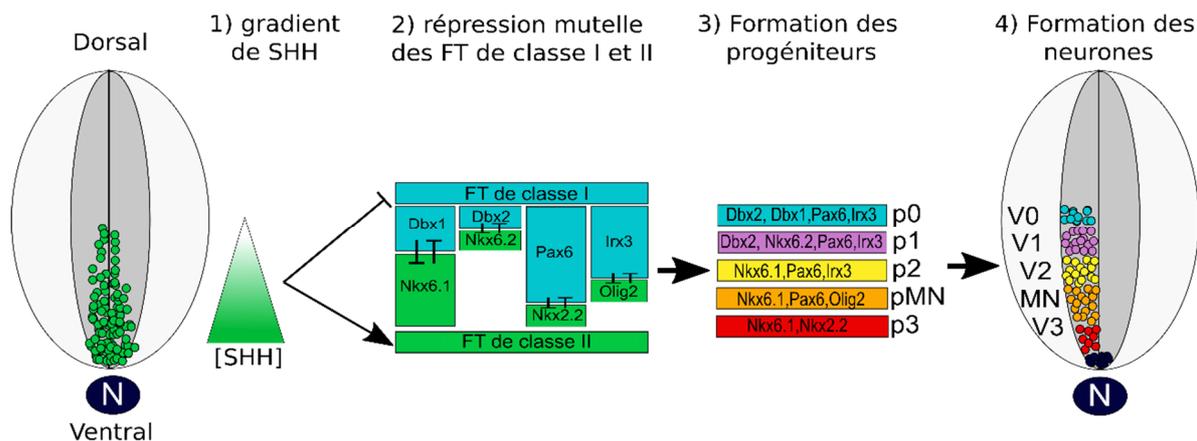
(A) En absence de Shh, Ptch inhibe Smo et conduit à la dégradation partielle de la protéine Gli (GliR). GR est transloqué dans le noyau et réprime la transcription de gènes cibles, comprenant des acteurs de la voie SHH tel *Gli1* et *Ptch*.

(B) Lorsque Shh se lie sur son récepteur, l'endocytose de Ptch permet l'activation de la protéine Smo et la translocation du facteur transcriptionnel Gli non tronquée dans le noyau pour activer l'expression de gènes cible dont *Gli1* et *Ptch*.

(Modifié d'après Andrew et al., 2019)

En fonction de la position des progéniteurs neuronaux dans la moelle épinière, l'expression des protéines de classe I et II en réponse au gradient de SHH va générer 5 domaines progéniteurs ventraux. Les domaines P0 à P3 donnent naissance à des interneurons et le domaine pMN génère les MNs. Chaque domaine exprime une combinaison caractéristique de facteurs de transcription à l'origine de leur destin cellulaire (Briscoe et al., 2000). Les frontières des différents domaines sont affinées via des interactions cross-répressives entre les différents facteurs de transcription. La combinaison des facteurs de transcription va ainsi diviser la partie ventrale de la moelle dans ces 5 domaines ventraux (Po à P3), puis au cours du temps, les progéniteurs de ces différents domaines vont se différencier en neurones (Figure 25).

La voie FGF participe à la régionalisation D-V des progéniteurs du tube neural en réprimant indirectement l'expression de facteur de transcription impliqués dans la mise en place des domaines de la moelle épinière. L'expression forcée du signal FGF prévient l'expression de *Pax6*, *Nkx6.1*, *Nkx6.2*, *Irx3* et *Foxa2* (Bertrand et al., 2000; del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003). L'inhibition du signal FGF dans l'embryon de poulet résulte en une expansion dorsale de l'expression des gènes *Olig2* et *Nkx6.1* (Morales et al., 2016).



**Figure 25 : Effets du gradient d'activité de SHH sur la mise en place des différents domaines ventraux de la moelle épinière sur l'axe dorso-ventrale.**

- 1) Le gradient de SHH gouverne la mise en place de différents domaines de facteurs de transcription, sur l'axe D-V
  - 2) Les facteurs de transcriptions des classes I et II se répriment pour former les domaines de progéniteurs qui donnent naissance à différents types neuronaux dans la moelle épinière
  - 3) Selon la position des progéniteurs sur l'axe D-V, ces derniers vont exprimer une combinaison de facteurs de transcriptions déterminant dans leur identité finale.
  - 4) Différenciation des progéniteurs des différents domaines ventraux en neurones
- N : Notochorde FT : Facteur de transcription  
(Modifié d'après Andrew et al., 2019)

Cependant la conservation de populations de neurones ventraux V0 et V1 chez des souris déficientes en *Shh* suggérait que d'autres voies de signalisation participent à la spécification de ces populations de neurones ventraux (Chiang, 1996; Litingtung and Chiang, 2000). Il a alors été montré que la signalisation de l'AR intervient dans les mécanismes de spécification des interneurones V0 et V1 (Pierani et al., 1999; Wilson et al., 2004). De plus, en présence d'AR, la culture d'explants de plaque neurale de poulet aboutit à la spécification de progéniteurs spinaux d'identité intermédiaire ou dorsale. Ces résultats ont été confirmés sur des cultures de cellules souches embryonnaires de souris (Novitch et al., 2003; Okada et al., 2004). L'action de l'AR dans la régionalisation dorso-ventrale des progéniteurs du tube neural consiste en :

- 1) la limitation de la formation de progéniteurs ventraux. L'AR régule positivement la transcription des facteurs de transcription de classe I et limite la régionalisation ventrale des progéniteurs induit par la voie *Shh* (Briscoe and Novitch, 2008; Novitch et al., 2003; Okada et al., 2004).
- 2) la spécification des progéniteurs localisés dans la partie moyenne de la moelle. La régulation positive des facteurs de transcription pro-dorsalisant *Dbx1* et *Dbx2* par l'AR semble impliquée dans la

différenciation directe des neurones du domaine V0 et V1 (del Corral et al., 2003; Pierani et al., 2001, 1999).

De plus, des embryons de caille déficiente en vitamine A (source de synthèse de l'AR) présente une diminution du taux de MNs formés (Wilson et al., 2004) et, des cultures d'explants de tube neural en présence d'AR et de SHH induit une augmentation de cellules différenciées vers le destin MN (cellules Olig2+) (Novitsch et al., 2003). L'AR régule positivement la transcription de la protéine Neurogenine2 (Ngn2) (Ribes et al., 2008), impliquée dans la transition des cellules du stade progéniteur vers le stade neuronal. La formation ectopique de MNs dans les embryons de poulet électroporés pour *Olig2* et *Ngn2* montrent le rôle combiné de ces deux facteurs de transcription dans la différenciation des MNs (Mizuguchi et al., 2001). Ainsi, l'AR et Shh participent tous deux à la spécification des cellules du domaine pMN lesquelles, au cours du développement, donneront naissance aux MNs ou aux oligodendrocytes.

La spécification des progéniteurs de MN a également été étudié chez l'Homme. En effet, des études par immunomarquage sur des embryons humains de 30 jour post-fécondation ont permis d'identifier que les domaines dorso-ventraux (et leur marqueurs) sont similaires à ceux observés chez le poulet et la souris. Cependant, chez l'Homme, il a été observé qu'une fraction des MNs sont formés à partir d'une population ventrale de progéniteurs des MNs coexprimant les marqueurs du domaine des progéniteurs des MNs (OLIG2+) et le marqueur du domaine des neurones ventraux (NKX2.2+). Or la coexpression de ces marqueurs dans les progéniteurs donnant naissances aux MNs n'a pas été observée chez la souris et le poulet (Marklund et al., 2014). A titre de rappel, les MNs chez la souris sont issus de progéniteurs Olig2+ Nkx2.2-. Ainsi de manière intéressante, le développement humain présente des différences avec les modèles murin et aviaire.

#### c) Différenciation des progéniteurs de motoneurones en motoneurones

Le corps cellulaire des progéniteurs formés dans les différents domaines D-V transite entre la lamine basale et apicale du tube neural. La transition de l'état de progéniteurs à l'état de neurone se traduit par l'expression de facteurs de transcription, une sortie du cycle cellulaire et un mouvement du corps cellulaire vers le domaine latéral de la moelle épinière appelé la zone du manteau (ZM). La transition commence aux alentours du stade E9.5 chez la souris et avant le 31<sup>ème</sup> jours chez l'Homme. Les gènes proneuraux qui codent pour des facteurs de transcription à domaine bHLH vont réguler la sortie du cycle cellulaire puis la différenciation neuronale. Dans le cadre de la spécification des pMNs en MNs, l'expression d'Olig2 induit par SHH et AR et de Pax6 induit par l'AR dans les pMN régulent positivement l'expression de Ngn2, facteur de transcription impliqué dans la sortie des cellules dans le

cycle cellulaire (Lacomme et al., 2012). Par rétro contrôle, Ngn2 réprime l'expression des facteurs de transcription caractéristiques des pMNs : *Pax6* et *Olig2*. Il existe un ratio *Olig2/Ngn2* cruciale dans les pMN pour déterminer leur différenciation vers un destin MN ou oligodendrocyte : une forte expression de Ngn2 permet la différenciation vers les MNs, tandis qu'une forte expression de *Olig2* maintient l'état des pMN. Cet équilibre permet de générer des MNs tout en préservant une partie des pMN qui donneront plus tard les oligodendrocytes (Lee et al., 2005). Dans le contexte d'une différenciation des pMNs vers MNs, Ngn2 augmente l'expression de Delta, un récepteur membranaire qui active le récepteur de la voie Nocth des cellules environnantes et permet l'inhibition de la voie Notch de la propre cellule. Cette inhibition de la voie Notch induit la diminution de l'expression de ses gènes cibles, dont *Hes1* et *Hes5*, qui codent pour des facteurs de transcription inhibant la différenciation neuronale et maintenant les cellules en division (Ohtsuka et al., 1999; Shimojo et al., 2011). De plus, *Olig2* agit sous forme de dimère pour cibler spécifiquement *Hes5* et inhiber leur transcription (Sagner et al., 2018). Cette inhibition participe à la différenciation des MNs comme illustré par l'inhibition pharmacologique de la voie Notch *in vivo* et *in vitro* qui aboutit la formation précoce et ectopique de MNs (Nelson et al., 2007, 2007). La voie Notch agit de manière unilatérale, et l'interaction entre deux cellules progénitrices permet la différenciation neurale d'une cellule et le maintien de l'état progéniteur de l'autre.

Ngn2 active également l'expression de facteurs généraux de différenciation appartenant à la famille de gènes *neuroD* et *NeuroM* (Bel-Vialar et al., 2007; Bertrand et al., 2002). Lors de la transition des pMN vers l'état MN, les cellules sont caractérisées par l'expression de facteurs de transcription à Homéodomaine tels que le facteur de transcription Hb9 et Lim-HD (*Isl1*, *Isl2*, *Lhx3*) pouvant s'associer à Ngn2. Dans les MNs spinaux post-mitotiques, leur combinaison induit la formation de complexes hétéromères et homomères activant des programmes de différenciation (Erb et al., 2017 ; Ericson et al., 1992 ; Lee et al., 2005; Lee and Pfaff, 2003; Mazzoni et al., 2013).

Dans un premier temps, ces protéines contrôlent les propriétés communes à tous les MNs puis dans un second temps, par leur maintien ou répression, régulent la différenciation des MNs en colonne. Ainsi l'expression de *Lhx3* est conservée uniquement dans les MNs CMM, tandis que *Hb9* est réprimé dans les MNs CML médian et *Isl1* est réprimé dans les MNs CML latéraux (décrit dans la partie formation des colonnes). Au cours du développement, la spécification des MNs le long de la moelle épinière provient de pMN spécifiés par l'action combinatoire de facteurs extrinsèques dans la partie ventrale de la moelle épinière.

## 5. La formation des MNs chez l'Homme

Peu d'études ont été réalisées permettant d'identifier les stades de développement humain où se mettent en place la formation du tube neural et la formation des MNs. La formation de la plaque neurale démarre au dix-huitième jour post fécondation (du Plessis and Volpe, 2018). La période de formation des MNs dans le tube neural n'est pas totalement définie. Ramon y Cajal a identifié les MNs naissants dans la moelle épinière humaine au stade de la quatrième semaine de développement. Plusieurs études histologiques réalisées sur des embryons humains ont permis de confirmer que la genèse des MNs est commencée à la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation (Altman and Bayer, 2001). L'observation d'embryons au stade de 8,5 semaines révèle que cette genèse le long de l'axe R-C est déjà terminée (Bayer and Altman, 2002). En parallèle, l'étude par HIS et immunomarquage de l'expression de HB9 dans les cellules du tube neurale permet d'identifier l'expression d'HB9 par les cellules de la corne ventrale de la moelle épinière à partir du jour 31-35 post-fécondation (Hagan et al., 2000). En parallèle, il a été suggéré que l'expression d'HB9 dans la zone sous-ventriculaire correspondrait aux progéniteurs de MN en cours de différenciation en MNs. Basée sur cette hypothèse, la genèse des MNs le long de l'axe R-C chez l'Homme se passerait entre le Jour 31 et 51 post fécondation. Mais ceci reste une estimation. La détection de l'expression d'HB9 dans la partie antérieure de la corne de moelles humaines au stade 30 jours post-fécondation suggèrent déjà la formation de nombreux MNs (Marklund et al., 2014). De plus, contrairement aux MNs, les pMNs ne projettent pas d'axones vers leur cible. Or, lors d'études anatomiques sur des embryons humains âgés de 20 à 30 jours révèlent des projections d'axone (Mai and Paxinos, 2011; Streeter, 1905). En parallèle, il est estimé que la formation des colonnes de MNs apparaîtrait entre le stade 6,5 semaines et 7 semaines de gestation (Bayer and Altman, 2002).

Chez les vertébrés, la formation du système moteur dépend de la spécification d'une grande diversité de motoneurones innervant les différents muscles du corps. Cette diversité se met initialement en place pendant l'élongation axiale de la moelle épinière depuis les régions cervicales jusqu'aux régions sacrées. Des études principalement chez le poulet et la souris ont montré que :

1) cette élongation est nourrie par cellules progénitrices souches qui se trouvent dans la zone caudale de l'embryon en développement. Une partie de ces progéniteurs qui fabriquent l'axe sont des progéniteurs donnant naissance à la fois au mésoderme paraxial et à l'ensemble de la moelle épinière.

2) Ces progéniteurs changent d'identité au cours de l'élongation comme démontré par l'activation séquentielle des gènes *Hox* dans ces cellules. Plus les progéniteurs sont âgés plus ils expriment de gènes *Hox* et plus ils vont donner naissance à des régions caudales de l'embryon. Le modèle dominant

actuel propose que l'identité des régions sera instruite par le code Hox reçu des progéniteurs axiaux bien que des données montre aussi la possibilité de régulation de ces gènes dans les tissus spinaux ou mésodermaux. La prolifération et le maintien des progéniteurs caudaux dont les neuromésodermaux qui permettent l'élongation est sous contrôle des voies WNT, FGF et GDF11, tout comme l'induction des gènes *Hox*, ce qui a conduit à proposer que les deux événements sont intimement liés. Cependant les mécanismes sous-jacents aux deux processus restent encore mal définis et en particulier les mécanismes gouvernant la temporalité des changements de compétence des progéniteurs incluant l'activation progressive des gènes *Hox* au cours du temps pour donner différents types cellulaires.

3) La différenciation des progéniteurs neuromésodermaux en progéniteurs neuraux est induite par l'acide rétinoïque secrété par les somites adjacents. Ces progéniteurs quittent la zone proliférative caudale pour entrer dans la région préneurale où ils sont exposés à des signaux qui vont influencer leur destin sur l'axe dorso ventral. En particulier, les cellules exposées à Shh vont acquérir une identité ventrale. Dans cette région un des domaines de progéniteurs correspond aux progéniteurs de MNs qui vont se différencier en MNs. Sous l'influence des Hox différenciellement exprimés le long de l'axe R-C, les MNs vont acquérir des propriétés distinctes assurant la mise en place de colonnes motrices et de pools moteurs et l'innervation précise des muscles cibles.

Cependant, les mécanismes conduisant à l'induction et l'expression différentielle des gènes *HOX* restent mal connus tout comme l'éventuelle conservation de ces différents événements chez l'Homme. Ceci est en partie lié à la difficulté à accéder à des populations rares de cellules dans les embryons et bien évidemment l'impossibilité d'étudier ces mécanismes sur des embryons humains. L'utilisation de cellules souches pluripotentes humaines représente donc une opportunité unique d'aborder ces questions.

## D. Les CSpH : un outil d'étude du développement

La diversification cellulaire à partir d'un *pool* de cellules souches lors du développement embryonnaire dépend de nombreux facteurs (différentes voies de signalisation) et de nombreux paramètres (temps, concentrations de facteurs, prolifération cellulaire, cross-link entre différentes voies de signalisations, ...). Cette quantité importante de phénomènes simultanés fait des embryons un système d'étude complexe pour déchiffrer comment les cellules interprètent l'exposition à des signaux extrinsèques pour se différencier. Dans le cas de populations cellulaires difficiles d'accès chez l'Homme comme les MNs, leur caractérisation moléculaire, transcriptionnelle et protéique reste compliquée voire impossible. La différenciation ciblée de cellules souches pluripotentes humaines (CSpH) en MNs représente une approche alternative pour ces études et constitue un moyen unique d'étudier le développement de certains types cellulaires dans un contexte génétique humain. Les CSP sont issues de la masse interne du blastocyste, structure embryonnaire caractéristique obtenue 5 ou 7 jours après fécondation *in vitro*. Elles se caractérisent par deux propriétés cardinales : une capacité d'auto-renouvellement, qui fait que ces cellules représentent une source illimitée de matériel, et une capacité à donner naissance, en théorie, à l'ensemble des types cellulaires que forment un organisme et qui définit la notion de pluripotence. Depuis plus de 20 ans qu'elles ont été isolées pour la première fois, un grand nombre d'études ont été réalisées à la fois pour maîtriser leur capacité de prolifération et de différenciation. Ces connaissances croissantes offrent des modèles cellulaires nouveaux qui permettent d'appréhender à la fois des questions développementales et également physiopathologiques.

### 1. Les cellules souches pluripotentes

#### a) Leurs origines

Il existe deux sources pour obtenir des cellules souches pluripotentes humaines : 1) Les cellules souches embryonnaires (CSE) qui représentent la source physiologique de cellules souches pluripotentes humaines et qui sont issues de la masse cellulaire interne d'embryons surnuméraires provenant uniquement d'une fécondation *in vitro*. 2) Les cellules souches induites à la pluripotence (CSPi) sont générées à partir de cellules somatiques adultes par modification génétique. Ce phénomène, appelé reprogrammation, permet de générer des cellules souches présentant les deux propriétés cardinales des CSE, à savoir l'auto-renouvellement et la pluripotence. Les premières CSE

généérées étaient issues d'embryons de souris. Les méthodes de dérivation reposent soit sur la mise en culture d'embryons entiers soit sur une étape de dissection des blastocystes permettant de séparer les cellules ES du reste de l'embryon. Elles sont mises en culture sur des cellules nourricières, comme les fibroblastes embryonnaires murins dont la prolifération a été inactivée et qui sécrètent des facteurs essentiels au maintien de la pluripotence. Les cellules souches embryonnaires murines (CSEm) forment, dans ces conditions, des colonies compactes qui, dissociées en petits morceaux, par des méthodes enzymatiques ou mécaniques, génèrent de nouvelles colonies (Evans and Kaufman, 1981, Martin, 1981). Plus d'une dizaine d'années plus tard, cette technique a été étendue aux embryons humains et la première lignée humaine de CSE a été établie. De par les deux propriétés qui les caractérisent, l'auto-renouvellement et la pluripotence, ces CSEh ont tout de suite enthousiasmé la communauté scientifique en offrant de nouvelles perspectives notamment en termes de médecine régénératrice. C'est ainsi que des lignées de CSEh de "grade clinique" ont été générées en l'absence totale de facteurs exogènes (Tannenbaum et al., 2012). La dérivation de telles lignées ainsi que leur conversion en un type cellulaire spécifique ont permis récemment la réalisation des premiers essais cliniques visant différentes pathologies tels que des insuffisances cardiaques ou des atteintes rétiniennes (da Cruz et al., 2018; Menasché et al., 2015).

Parallèlement, une autre application biomédicale offerte par les CSEh repose sur la possibilité d'avoir accès à des cellules porteuses d'une mutation causale d'une maladie génétique et obtenues au cours d'un diagnostic pré-implantatoire (DPI). On estime aujourd'hui à environ 150 lignées de CSEh porteuses de mutations qui ont été dérivées offrant ainsi la possibilité de modéliser une trentaine de maladies génétiques humaines (Ben-Yehudah et al., 2012). Ces lignées représentent en effet un outil intéressant pour étudier les conséquences que peut avoir une mutation dans la spécification, le maintien ou la fonction d'un type cellulaire précis. Les premières études démontrant ce paradigme expérimental ont été ainsi réalisées dans le cadre de la maladie neurodéveloppementale du syndrome de l'X fragile ou de la forme congénitale de la myotonie de Steinert, maladie neuromusculaire incurable (Eiges et al., 2007; Marteyn et al., 2011). Le nombre de maladies génétiques humaines pouvant être modélisées par cette approche reste cependant limité de par le faible nombre de pathologies bénéficiant d'un DPI et de la faible efficacité de dérivation de lignées CSEh (Ben-Yehudah et al., 2012).

De plus, l'utilisation de CSEh soulève un grand nombre de questions éthiques. Ceci a conduit de nombreuses équipes à s'intéresser à la possibilité de générer des cellules souches pluripotentes humaines sans avoir à utiliser des embryons humains. C'est ainsi que l'équipe du Pr. Shinya Yamanaka a identifié en 2006 la possibilité de convertir génétiquement des cellules somatiques adultes en cellules présentant les deux propriétés cardinales des CSE et qui dès lors ont été appelées « cellules souches induites à la pluripotence » (CSPi) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces travaux réalisés

initialement sur des cellules murines ont été très rapidement étendus aux cellules humaines (Takahashi et al., 2007). Cette découverte s'appuie sur des travaux de transdifférenciation initiés il y a plus de 50 ans et basés sur la reprogrammation de cellules somatiques par transfert nucléaires dans des ovocytes non fécondés (Gurdon, 1962). En étudiant 24 gènes connus pour être impliqués dans le maintien de la pluripotence, l'équipe du Pr. Yamanaka a pu identifier une combinaison de 4 gènes, *Oct4* (ou *POU5F1*), *SOX2*, *KLF4* et de l'oncogène *c-Myc*, nécessaires et suffisants pour induire les mécanismes de reprogrammation. Des résultats similaires ont été obtenus la même année par l'équipe américaine de James Thomson qui dans son cas utilisait les facteurs *Oct4*, *SOX2* en combinaison avec les gènes *Lin-28* et *NANOG* (Yu et al., 2007).

L'expression combinée de ces différents facteurs permet d'induire à nouveau le programme transcriptionnel lié à la pluripotence et de réprimer l'état différencié des cellules. Malgré l'observation d'une mémoire épigénétique des CSPi issues de leur tissu d'origine (Tesarova et al., 2016). Ces cellules sont capables de générer les trois feuilletts embryonnaires. Les mécanismes associés à cette mémoire épigénétique ont été régulièrement décrits (Kumar et al., 2013) et semblent diminuer au cours des passages successifs des CSPi (Kim et al., 2010; Polo et al., 2010; Tesarova et al., 2016). Démontrant l'importance de cette découverte, en offrant la possibilité de générer en théorie à partir de n'importe quel individu sa « copie embryonnaire », les Pr. Gurdon et Yamanaka ont reçu le prix Nobel de Médecine en 2012.

Depuis plus de 10 ans que les premières lignées de CSPi ont été décrites, ce domaine de recherche a été en continuelle évolution. Alors que les premières CSPi générées utilisaient des méthodes virales intégratives pour exprimer les 4 facteurs de reprogrammation, des approches non intégratives ont été développées (Churko et al., 2013). De même, il est maintenant possible de générer des CSPi à partir des cellules mononuclées du sang alors que les premières reprogrammations utilisaient comme source de cellules somatiques adultes, des fibroblastes issus de biopsies cutanées. Parallèlement, ces 10 dernières années ont été accompagnées d'un accroissement considérable des connaissances quant aux mécanismes régulant le maintien de la pluripotence ainsi que les premières étapes permettant de sortir de cet état. Ceci a abouti au développement de nouvelles techniques permettant de faciliter et de démocratiser l'utilisation des CSPi (Karagiannis et al., 2019; Takahashi and Yamanaka, 2016).

#### b) Contrôle des propriétés cardinales des CSPi

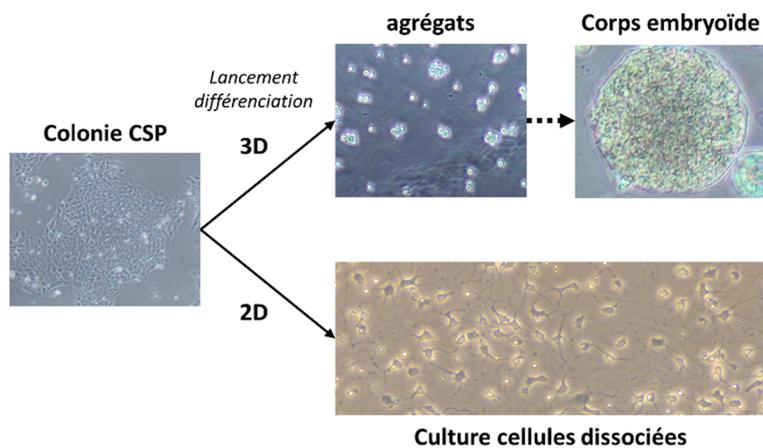
Le comportement des CSPi, quelle que soit leur origine, repose sur un équilibre fragile entre maintien de la pluripotence et différenciation. Les conditions de culture à l'état indifférencié ont été

établies pour prendre en considération cet équilibre ainsi que deux caractéristiques essentielles : l'auto-renouvellement et la conservation d'un caryotype normal. Les conditions de culture des CSPh à l'état indifférencié ont énormément évoluées ces dernières années. Les premières cultures de CSPh reposaient sur :

i). L'utilisation d'un milieu supplémenté de facteurs extracellulaires activant des voies de signalisation impliquées dans la pluripotence conjointement à l'inhibition des voies de différenciation. Plusieurs molécules ont ainsi été identifiées pour être nécessaires au maintien de la pluripotence comme le FGF2, l'Activine A et le TGF $\beta$  (Eiselleova *et al.*, 2008). Ces facteurs induisent l'expression de gènes comme *OCT4* et *NANOG*. Ce dernier est d'ailleurs considéré comme le gardien de la pluripotence puisque son inactivation est suffisante pour induire la différenciation des cellules (Scerbo *et al.*, 2012). Il a été montré que l'expression de *NANOG* est contrôlée par l'activation de la voie Activine/Nodal qui au travers de l'induction des facteurs SMAD2/3 active son promoteur (Vallier *et al.*, 2006).

ii). Une co-culture avec des cellules nourricières, dont la prolifération était arrêtée soit par irradiation soit par traitement chimique (avec de la mitomycine C). De grands progrès ont été réalisés dernièrement permettant de remplacer cette co-culture, lourde à mettre en place, par des supports traités spécifiquement pour permettre la croissance illimitée de CSEh, tels que le matrigel ou la vitronectine. De même, alors que les premières cultures de CSEh reposaient sur des passages manuels chronophages à l'aide d'une aiguille sous une loupe binoculaire, le développement de techniques enzymatiques plus rapides et compatibles avec la croissance des CSEh a été développé. Ceci permet de pouvoir amplifier beaucoup plus facilement ces cellules et de générer une amplification robotisée de ces cellules (Koagaya *et al.*, 2015).

La culture des lignées de CSPh doit s'accompagner de contrôles fréquents permettant d'évaluer le maintien de la pluripotence. Différents paramètres sont mesurés tels que l'expression des marqueurs membranaires SSEA3 (pour *Stage Specific Embryonic Antigen 3*), SSEA4, TRA-1-60 (pour *Tumour Rejection Antigen*), TRA-1-81 et l'expression des facteurs de transcription *OCT4*, *NANOG* et *SOX2*. Au niveau chromosomique, différentes études ont montré que l'amplification à long terme des lignées CSEh, bien qu'elles soient considérées comme immortelles, peut s'accompagner de défauts chromosomiques tels que le gain ou la perte de chromosomes entiers ou partiels (Lefort *et al.*, 2008; Lund *et al.*, 2012; Taapken *et al.*, 2011). Une analyse caryotypique est donc essentielle pour caractériser l'intégrité génomique des lignées (Takahashi and Yamanaka, 2016). Pour finir, leur potentiel de pluripotence repose également sur l'évaluation de la capacité des CSEh à se différencier *in vitro* et *in vivo*. Une des méthodes les plus répandues pour évaluer ce potentiel se base sur leur capacité à se différencier de façon spontanée par la formation de corps embryoïdes (EB pour *Embryoid*



**Figure 26 : Lancement de différenciation à partir des cellules souches pluripotentes *in vitro*.**

Culture de CSP sous forme de colonie, ces cellules lancées en différenciation sur un support sans adhérence s'agrègent et forme des corps embryotaire (CE). L'ensemencement des PSC dissociées sur un support avec une matrice biologique permet une différenciation des CSP sous format dissocié et en 2D.

immunodéficientes et la formation en quelques semaines de tératomes, tumeurs embryonnaires composées de progéniteurs des 3 feuillets embryonnaires.

Parallèlement à ces méthodes, ces dernières années ont été synonymes d'énormes avancées en termes de différenciation ciblée des lignées CSEh (Figure 27). Ne pouvant pas aborder l'ensemble de ces développements, je limiterai le reste de ce chapitre aux progrès qui ont été réalisés dans le cadre de la spécification des lignées CSEh en MN. En effet, outre l'intérêt que ces développements ont représenté pour mon travail de thèse, ils représentent un exemple paradigmatique des difficultés rencontrées pour ce type d'approche.

*bodies*) en condition de culture non adhérente et en absence de tous facteurs extracellulaires. Ces structures flottantes de forme sphérique regroupent des progéniteurs des 3 feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (Figure 26). Le caractère pluripotent des CSEh peut être également évalué *in vivo* par l'injection sous cutanée de ces cellules dans des souris

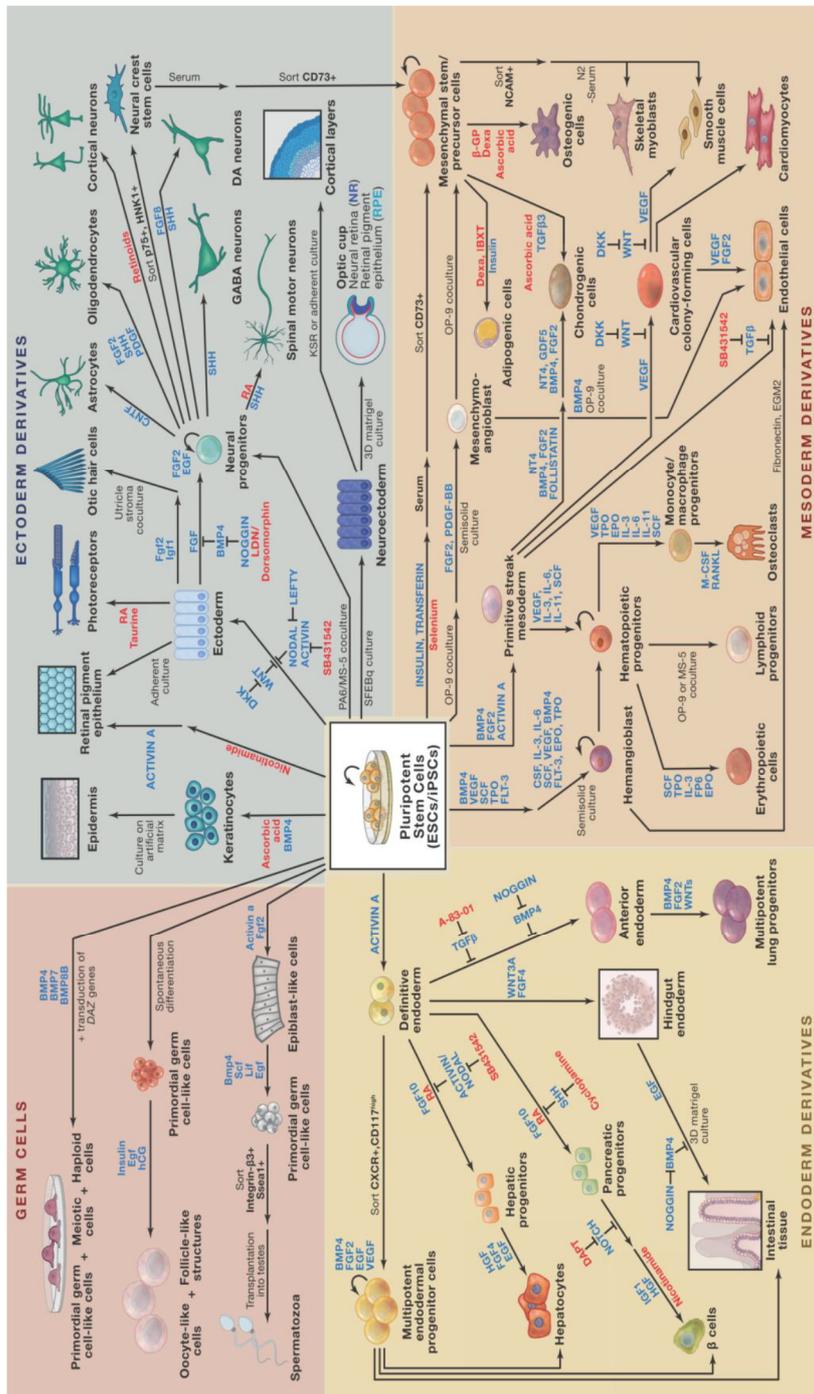


Figure 27 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans la spécification des CSP en cellules d'intérêt.

L'utilisation de cytokines et de petites molécules permet de définir des protocoles de différenciation vers des types cellulaires intermédiaires et matures au sein des 3 feuilletts embryonnaires et des lignées germinales. (D'après Williams et al., 2012)

## 2. Génération de motoneurones *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes

L'utilisation des CSE et l'avènement de la découverte de CSPi ont ouvert un nouveau champ exploratoire des populations cellulaires rares de l'organisme et des processus impliqués dans leur développement. Différents protocoles de différenciation des CSP en MNs ont ainsi été développés depuis l'accès aux CSP murines et humaines. Les stratégies de différenciation se basent sur l'induction spécifique de gènes impliqués dans la génération de progéniteurs de MNs ou de MNs (Goparaju et al., 2017; Goto et al., 2017; Zhang et al., 2017). Dans le cadre d'études sans génie génétique, les protocoles de différenciation des CSP en MN sont basés sur l'utilisation de facteurs intervenant dans les différentes étapes du développement des MNs.

### a) Protocoles initiaux

#### *i. Génération de motoneurones*

L'étude menée par le Dr Wichterle en 2002 a montré la possibilité de diriger les CSE de souris vers un destin motoneuronal en utilisant des facteurs impliqués dans certaines phases du développement des motoneurones *in vivo* (Wichterle et al., 2002). L'exposition des CSE murine après deux jours de différenciation à l'acide rétinoïque et à un agoniste de la voie Shh induit la spécification des progéniteurs de MNs en 4 jours puis de MNs entre 5 et 6 jours de différenciation (environ 50% des cellules obtenues sont des MNs). La fonctionnalité de ces MNs obtenus *in vitro* a été validée par la greffe de ces cellules dans la moelle épinière de poulet ou de rat où ils sont capables d'innover les muscles de l'hôte (Harper et al., 2004; Wichterle et al., 2002, Peljto et al., 2011). Quelques années plus tard il a été démontré qu'en utilisant les mêmes molécules il était possible de générer des MNs humains. Cependant l'efficacité (environ 10% de MNs) et la lenteur de la différenciation (environ 50 jours) montrait que les signaux permettant de générer les MNs humaines étaient mal contrôlés. (Li et al., 2005 ; Shin et al., 2005). Par la suite de nombreuses équipes ont développé différents protocoles de différenciations basés sur l'utilisation de RA et SHH (Faravelli et al., 2014; Sances et al., 2016; Trawczynski et al., 2019) représentés en table 2.

**Tableau 2 : Résumé de protocoles de différenciation de motoneurones à partir de cellules souches pluripotentes induites**

Année	Protocole	CPN	Progéniteurs de MN	MN mature	Sous-type de MN	Electrophysiologie	JNM <i>in vitro</i>	Intégration <i>in vivo</i>	Durée (CSPi à MN)	Efficacité (%)
2009	Chambers et al., 2009	Pax6, Nestin	-	Isl1, HB9	-	-	-	-	~19 jours	-
2009	Karumbayaram et al., 2009	Brn2, Sox3, Pax6, Nestin	Nkx6.1, Olig2	βIII-tubulin, ChAT, ISL1, HB9	Cervical	Patch clamp induit	-	-	~40 jours	~30
2011	Hester et al., 2011	PSA-NCAM, Otx2	-	ChAT, HB9	Cervical, thoracique	Patch clamp induit/spontané	OUI	-	11-30 jours	49-72
2013	Amoroso et al., 2013	βIII-tubulin	-	HB9, Isl1, Isl2, NEFL, RET, CHAT, CHT1, VACHT, CHRNA3, CHRNA4, CHRN2, CHRN2	Brachial, CML (m/l)	Patch clamp induit	-	Embryons de poulet	~21 jours	50
2014	Qu et al., 2014	Pax6, Sox1, Zic1	-	FOXP1, LHX3, RALDH2, βIII-tubulin, HB9	-	Patch clamp induit	OUI	-	~20 jours	~30-52
2015	Maury et al., 2015	Pax6, Nestin	NKX6.1, Olig2	HB9, ISL1, ChAT, Foxp1	CML	Patch clamp induit	OUI	-	~14 jours	~77
2015	Du et al., 2015	Sox1, Hoxa3, Otx2	Olig2	Mnx1, Isl1, ChAT	-	Patch clamp induit	OUI	Embryons de poulet	~28 jours	~90
2015	Lippmann et al., 2015	Pax6, Sox2, HOX1-9, CDX1, CTNNA1	-	βIII-tubulin, Isl1, SMI-32, synapsin, HB9	Potentiellement tous les sous-types: Cervical, thoracique, lombaire	Patch clamp induit/spontané	-	-	~21 jours	-
2017	Goparaju et al., 2017	Tubb3, Tkda3-4	-	Isl1, HB9, ChAT	-	Patch clamp induit	-	-	~7-14 jours	94-100
2017	Lukovic et al., 2017	Map2, NeuN, Pax6, Sox1, Zic1, Zo1, Musashi, Bf1, OTX2, A2B5, Nestin, Sox2, βIII-tubulin, Dach1	-	Isl1, Isl2	Cervical	Patch clamp induit/spontané	-	Souris	~49 jours	-

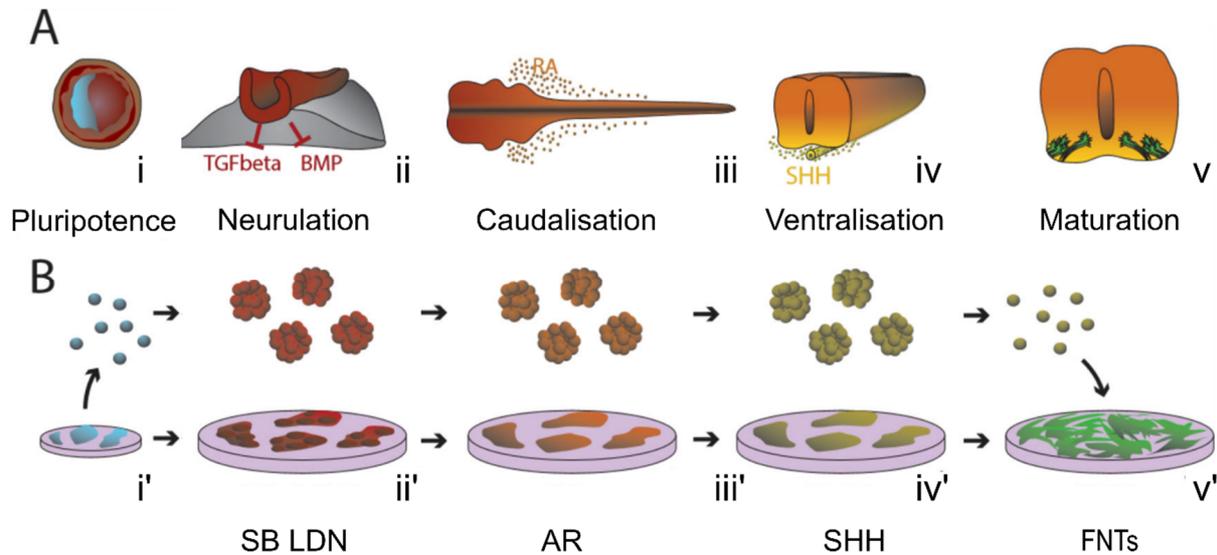
*D'après le tableau de Trawczynski et al., 2019*

*Il est possible de voir au fur et à mesure des années une amélioration des protocoles avec une durée de différenciation plus courte et une efficacité améliorée. Néanmoins, les MNs différenciés sont rarement caractérisés, ou ne correspondent qu'à une seule fraction des sous-types de MNs présent le long de l'axe R-C de la moelle épinière. Le protocole développé par Lippmann et al., 2015 pourrait potentiellement donner ces sous-types, mais leur étude n'a pas identifié l'identité des MNs selon leur position sur l'axe R-C.*

De manière générale, le développement des protocoles de différenciation de CSP en MNs repose sur quatre étapes majeures (Figure 28) :

1. Neuralisation
2. Caudalisation
3. Ventralisation
4. Maturation

La qualité d'un protocole de différenciation dépend de son efficacité de différenciation mais aussi de sa rapidité puisque la durée de nombreux protocoles excède la durée de génération des premiers MNs *in vivo* (environ 14 à 16 jours post implantation). L'amélioration des protocoles de différenciation au cours des années a donc consisté à améliorer le pourcentage de cellules correctement orientées et le temps nécessaire à chaque étape afin de se rapprocher des étapes du développement normal.



**Figure 28 : Schématisation des étapes de développement des motoneurones mimées *in vitro*.**

(A) Représentation des étapes développementales *in vivo* des MNs. (B) Etapes développementales reproduites *in vitro*. (i) A partir du blastocyste ou (i') des cellules souches pluripotentes. (ii) Formation du neural ectoderme par inhibition de la voie BMP, (ii) cette formation est mimée par l'utilisation des inhibiteurs des protéines SMAD LDN193189 et SB431542 (LDN, SB). (iii) La caudalisation des progéniteurs neuronaux, (iii') elle est mimée par l'exposition des progéniteurs à l'AR pour spécifier les progéniteurs du rhombencéphale ou de la partie antérieure la moelle épinière. (iv) Sécrétion de SHH par la notochorde et la plaque du plancher et ventralise l'identité des progéniteurs neuronaux sur l'axe D-V, (iv') la ventralisation *in vitro* est mimée par un agoniste d'acteur de la voie de signalisation SHH. (v) *In vivo* les motoneurones sont exposés à des facteurs trophiques pour projeter leur axone vers les muscles cibles. (v') Les MNs *in vitro* sont exposés à des facteurs neurotrophiques tel que GDNF, BDNF, CNTF. Ces facteurs assurent la maturation et la survie des MNs.  
 BMP = Bone morphogenetic protein AR = Acide rétinoïque, SHH = Sonic hedgehog, FNTs = Facteurs neurotrophiques

## 1) Neuralisation

La transition des CSP en cellules neurales est la première étape de différenciation des CSP en MNs. Les premiers protocoles se basent sur une maintenance des CSP en culture sous forme 2D ou en CE, en l'absence de facteurs de pluripotence. La spécification des CSP en progéniteurs neuronaux se fait alors de manière spontanée. Les cellules d'intérêt sont ensuite isolées et cultivées dans un milieu proneural (Di Giorgio et al., 2008; Ebert et al., 2009; Hu and Zhang, 2009; Reubinoff et al., 2001; Zhang et al., 2001). Cependant, ces modes de différenciation requièrent une période de culture longue et peu efficace. Alors que la différenciation neurale spontanée repose sur de nombreuses étapes, le travail de Chambers a démontré que l'inhibition combinée des voies BMP et TGF- $\beta$  dans les cultures de CSP humaines permettait leur conversion efficace et rapide en précurseurs neurales (Chambers et al., 2009). L'exposition des CSP au SB431542 (inhibiteur des récepteurs activin like Kinase (Alk) 4, 5, 7, impliqués dans l'activité de la voie TGF- $\beta$ ) et au Noggin (protéine inhibitrice de la voie BMP, intervenant dans la neuralisation *in vivo*) inhibent la signalisation des protéines SMAD et permet la conversion de 80% des CSP en cellules neurales en deux semaines (Chambers et al., 2009). L'utilisation d'inhibiteurs de la voie BMP peut aussi remplacer Noggin (Dorsomorphin ou LDN193189) (Amoroso et al., 2013; Wada et al., 2009). Ces deux molécules avaient déjà été utilisées indépendamment dans des

protocoles de différenciation des CSP humaines en cellules neurales dans un format 2D ou 3D (Amoroso et al., 2013; Itsykson et al., 2005; Pera et al., 2004; Wada et al., 2009). L'efficacité de différenciation passe par un enrichissement de l'expression de protéines neurales PAX6 et de SOX2 qui répriment une possible différenciation des CSP vers le destin endodermal et mésodermal.

Il est à noter que l'utilisation d'agoniste de Wnt est utilisée dans les premiers jours de culture dans certains protocoles. Les cellules cultivées *in vitro* sont exposées au facteur Wnt, comme les cellules *in vivo* formant la ligne primitive, structure nécessaire à la formation de la moelle épinière. (Du et al., 2015 ; Maury et al., 2015).

## 2) Spécification des précurseurs neuraux vers une identité spinale antérieure

La spécification des progéniteurs neuraux correspondant aux cellules localisées sur l'axe D-V et R-C *in vivo* est régit par des gradients de signalisation. L'utilisation de facteurs extrinsèques dans les cultures de progéniteurs neuraux est la stratégie développée pour caudaliser leur identité. Plusieurs facteurs impliqués dans le développement interviennent dans cette spécification. Les premières spécifications caudales dépendent d'une exposition des précurseurs neuraux à une concentration élevée d'AR (Wichterle et al., 2002), permettant le passage des cellules du mésencéphale, caractérisées par OTX2+EN1+, à une identité spinale caractérisée par l'expression de HOXC5+, HOXC6+, SOX1+. Ce rôle de l'AR a également été observé par d'autres équipes, où ce dernier réprime l'expression de OTX2 et promeut la spécification de cellules exprimant des marqueurs d'identité caudaux (HOXB4+) (Li et al., 2008; Pankratz et al., 2007). Ces observations ont été validées à partir de cultures de CSE et CSPi humaines (Hu et al., 2010) .

## 3) Contrôle de l'identité dorso-ventrale des progéniteurs spinaux

Les progéniteurs spinaux sont les progéniteurs à l'origine de l'ensemble des neurones de la moelle épinière (Henrique et al., 2015). L'orientation *in vitro* comme *in vivo* des progéniteurs spinaux vers des progéniteurs motoneuronaux (caractérisés par NKX6.1 ; NKX6.2 puis OLIG2+ dans les progéniteurs de MNs) dépend de l'activité ventralisante de la voie SHH (Briscoe et al., 2001, 2000; Ericson et al., 1997; Wichterle et al., 2002). L'exposition en culture des progéniteurs à l'AR et au SHH, ou à un agoniste de la voie (SAG, Pumorphamine), selon une concentration et une fenêtre de temps établie, permettent la spécification au cours de la différenciation de progéniteurs de MNs OLIG2+ (Amoroso et al., 2013; Du et al., 2015; Hu and Zhang, 2009; Wada et al., 2009). Ainsi, cet exemple montre l'importance d'un gradient temporel et de concentration d'activité d'une voie de signalisation pour spécifier une population d'intérêt (maury et al., 2015, Wichterle et al., 2002).

#### 4) Induction des MNs post-mitotiques et maturation

La sortie des progéniteurs du cycle cellulaire induit l'arrêt de leur prolifération, suivi de leur différenciation en MN post-mitotiques, caractérisés par la coexpression de ISL1+ ; HB9+ (Ericson et al., 1992; Li et al., 2005; Pfaff et al., 1996). Les MNs générés sont immatures (Maury et al., 2015; Shimojo et al., 2015; Takazawa et al., 2012) et nécessitent d'être maintenus en culture pendant plusieurs jours pour devenir fonctionnel et présenter une activité électrophysiologique. La survie et la maturation de ces MNs *in vitro* est optimisée par l'ajout de facteurs de croissance neuronaux (Zurn et al., 1996). Les facteurs de croissances utilisés sont le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), GDNF (glial cell derived neurotrophic factor), CNTF (Ciliary neurotrophic factor) et IGF-1 (Insuline like growth factor 1). La culture et la maturation des MNs nécessite de se faire dans un format en 2D. Dans des conditions de culture 3D, les CE sont soit déposés sur une surface plane recouverte d'une matrice de lamine, ou alors ils sont dissociés et les MNs sont alorsensemencés sur un support 2D (Amoroso et al., 2013; Li et al., 2005; Maury et al., 2015). La maturation des MNs est caractérisée par une projection axonale et une capacité électrophysiologique des MNs, à savoir la génération d'un potentiel d'activation en réponse à un stimuli électrique ou chimique. L'activité électrophysiologique de ces MNs est étudié par patch-clamp (Li et al., 2005; Maury et al., 2015; Qu et al., 2014; Wada et al., 2009). La fonctionnalité des MNs humains générés est également prouvé par leur capacité à projeter leur axone vers les muscles cibles après transplantation dans une moelle épinière de poulet et de souris (Amoroso et al., 2013; Pepper et al., 2017).

#### b) [Protocoles alternatifs pour spécifier des MNs spinaux à partir de CSP](#)

Malgré une homogénéité dans les étapes de différenciation, certaines équipes ont développé des protocoles faisant intervenir des facteurs supplémentaires ou basés sur la suppression de facteurs semblant nécessaires. Dans un premier temps, les étapes de différenciation se font dans l'ordre neuralisation, caudalisation, puis maturation. Cependant, la formation des MNs *in vivo* se fait à partir d'une population dont l'identité caudale (CDX2+) apparaît avant l'identité neurale, et l'identité spinale des MNs obtenus *in vitro* est principalement cervicale/brachiale. Ces découvertes remettent en cause l'ordre des étapes de différenciation des CSP en MNs et la formation de progéniteurs CDX2+ avant l'étape de neuralisation. L'activation de la voie WNT dans les CSE murines promeut une spécification des cellules progénitrices de la ligne primitive (Tsakiridis et al., 2014) et l'activation de la voie WNT dans des cultures d'explant de cellules issues de la plaque neurale antérieure de poulet permet de

spécifier des progéniteurs spinaux (Nordström et al., 2006). Or, la récente étude réalisée par l'équipe du Dr Briscoe sur le rôle de la voie WNT dans la spécification des progéniteurs spinaux semble mettre en évidence le rôle de la voie WNT dans la régulation de l'identité R-C des cellules avant l'induction neurale (Metzis et al., 2018). De plus, la culture de CSE murines et humaines traitées avec un pulse de FGF et WNT, et couplées au SMADi induit la différenciation des CSP en progéniteurs ressemblant aux PNMs (Gouti et al., 2017, 2014). Ces progéniteurs sont capables de se différencier en MNs équivalents à ceux du domaine cervical à thoracique *in vivo*. Ainsi, l'activité précoce de la voie WNT dans la différenciation cellulaire permet d'optimiser la formation *in vitro* de cellules similaires aux PNMs et la spécification d'identité plus caudale que dans les protocoles sans activation extrinsèque de la voie WNT.

L'AR est un facteur essentiel de la différenciation *in vitro* des CSP en MNs, se retrouvant dans la quasi-totalité des protocoles et jouant un rôle dans la spécification des progéniteurs neuraux en progéniteurs spinaux. Cependant, l'inhibition de la voie de l'AR *in vivo* chez la caille et le poulet n'empêche pas la formation de la moelle épinière et une partie des MNs (Ensini et al., 1998; Maden et al., 1996; Sockanathan et al., 2003). Afin de déterminer si l'AR est nécessaire à la formation des MNs chez l'Homme, un protocole de différenciation des MNs sans AR, à partir de CSPh, a été développé (Patani et al., 2011). Il repose sur l'induction neurale des CSP à la suite de l'exposition à l'inhibiteur SB431542. Les progéniteurs neuraux sont ensuite exposés à la pumorphamine sans AR. La formation des progéniteurs MNs caractérisés par OLIG2+ se fait en 12 jours pour une efficacité de 50% et n'est pas entravée par l'absence d'exposition des cellules précurseurs neurales à de l'AR extrinsèque. De manière intéressante, lors de la ventralisation des progéniteurs sous l'effet de la pumorphamine, les progéniteurs n'acquièrent pas un profil d'expression PAX6+ mais un profil NKX2.2+, correspondant *in vivo* au domaine ventral P3 localisé en dessous du domaine des progéniteurs de MNs. Malgré l'absence de cellules PAX6+, les progéniteurs de MNs se forment, puis une partie se différencie pour donner des MNs spinaux ISL1+/HB9+ représentant environ 11% de la population finale.

La diversité du nombre de protocoles développés pour générer des MNs spinaux à partir de CSP humaines reflète la capacité des cellules à intégrer de manière différente plusieurs facteurs extrinsèques pour se différencier dans un type cellulaire donné (Sances et al., 2016). La diversité des MN spinaux *in vivo* est observable via l'expression d'une combinaison de marqueurs protéiques propre à chaque sous-type (selon les colonnes, selon l'identité R-C). La diversité des protocoles de différenciation est aussi reflétée dans la diversité des MNs obtenus et permet aussi de mieux comprendre le rôle des facteurs utilisés lors des différenciations *in vitro* sur la spécification des sous-types de MNs spinaux.

### *i. Spécification de sous-types de motoneurones*

Malgré une temporalité et une efficacité variable, différents protocoles de différenciation des CSP humaines en MNs spinaux ont été développés (généralement correspondant à une identité de sous-type de MN cervical). Cependant, la différenciation des CSP en différents sous-types de MN correspondant présent le long de l'axe R-C de la colonne vertébrale a reçu beaucoup moins d'attention. Déterminer les sous-types de MNs spinaux générés dans ces conditions est tout aussi important. Cela permet de mieux comprendre le rôle des facteurs extrinsèques dans les étapes de développement des sous-types de MNs chez l'Humain et d'accéder à des sous-populations spécifiquement affectées ou épargnées dans certaines pathologies (Kanning et al., 2010; Sances et al., 2016). Comme on l'a vu dans les études embryonnaires chez le poulet et la souris, l'identité en colonne des MNs dépend de leur identité R-C encodée par l'expression des gènes. Mais la caractérisation d'expression des HOX et des marqueurs de colonne des MNs différenciés à partir de CSP humaines n'a pas été faite de façon systématique (table 2).

Les MNs différenciés à partir de CSP murines dans les premiers protocoles sont majoritairement des MNs caractérisés par la coexpression HB9+ ; LHX3+, spécifique des MNs appartenant à la CMM. Certaines populations sont HB9+ ; LHX1+, ce qui correspond à des MNs de la CML latérale (Wichterle et al., 2002). Cependant, la différenciation de CSP murines en une population hétérogène de MNs aux caractéristiques de MNs CMM (LHX3+) ou CML (FOXP1+) est possible (Peljto et al., 2010). Dans le modèle humain, la différenciation des CSP en MNs peut donner différents sous-types de MNs dans une même population (Lippmann et al., 2015). Cependant, la modulation des paramètres d'exposition des CSP à certains facteurs suffit à enrichir une sous-population de MNs dans la population finale. La substitution de la molécule SHH par l'utilisation de SAG et pumorphamine pour activer la voie de signalisation SHH oriente les cellules progénitrices vers une identité des MNs CML (FOXP1+) (Amoroso et al., 2013). 70% des MNs différenciés ont une identité CML et plus que 10% de la population est CMM (LHX3+). L'AR joue aussi sur l'identité finale des MNs : la concentration de l'AR joue sur l'identité des MNs en division : l'exposition des progéniteurs à une forte concentration d'AR permet d'augmenter le pourcentage final de MN CML latéraux (LHX1+) (Amoroso et al., 2013) correspondant aux observations dans le modèle murin (Peljto et al., 2010). L'absence d'AR lors de la différenciation de CSP humaines et murines en MN prévient la différenciation de MNs CML (Patani et al., 2011), induit la formation du même taux de MNs CMM (LHX3+). Cependant, l'émergence d'une population MNs LHX3-, FOXP1- suggère la différenciation de cellules CMH. La régulation fine des voies de signalisation activées par des facteurs extrinsèques lors de la différenciation des CSP en MNs détermine en partie l'identité finale en colonne des MNs. Réussir à accéder aux différents sous-types de MNs *in vitro* est un des objectifs de la différenciation des CSP pour 1) mieux comprendre comment

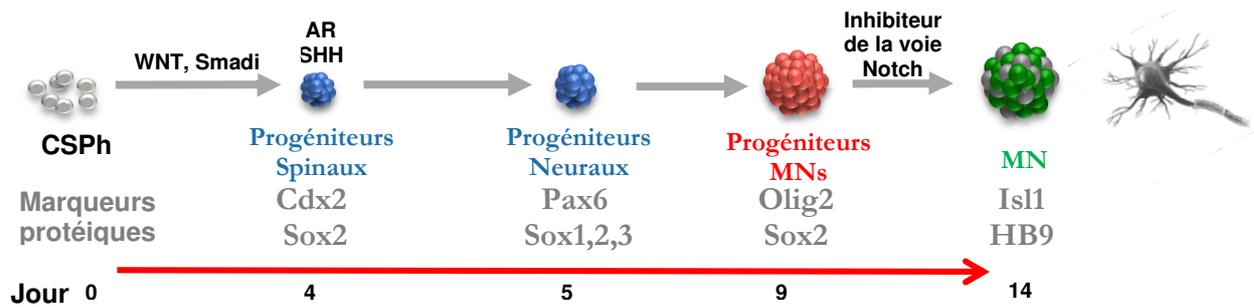
les voies de signalisation contrôlent ces diversités au cours du temps. 2) Obtenir les populations de MNs différenciellement atteintes dans les conditions pathologiques pour définir les propriétés intrinsèques à l'origine de leurs atteintes différentielles (Kanning et al., 2010; Sances et al., 2016).

Illustrant cette difficulté à reproduire *in vitro* les séquences de morphogènes impliquées dans la formation des MNs, entre 2005 et 2015, un grand nombre de méthodes de différenciation des CSPs humaines en MNs spinaux et principalement basées sur l'utilisation de l'AR et de SHH, ont été décrites. Cependant, toutes restaient relativement longues et inefficaces (25 à 52 jours pour un maximum de 40% des cellules acquérant un destin « MNs » (Amoroso et al., 2013; Hu and Zhang, 2009). Le temps et le matériel nécessaire reste imposant et la limite du taux de MNs complique les études de la diversification et la caractérisation des sous-types de MNs. Pour ces raisons, l'équipe de recherche dans lequel j'ai réalisé ma thèse s'est intéressée au rôle des facteurs dans la génération des progéniteurs des différentes étapes de différenciation des MNs spinaux afin de générer efficacement et rapidement des MNs à partir de CSP.

#### *ii. Spécification des MNs spinaux par activation précoce de la voie Wnt*

Les équipes dans lesquelles j'effectue ma thèse ont mis au point un protocole spécifiant rapidement et efficacement des MNs à partir de cellules souches pluripotentes (Figure 29) (Maury et al., 2015). Basé sur l'hypothèse que ces différenciations pouvaient être améliorées en contrôlant les combinaisons de morphogènes, ils ont mis en place la première méthode de différenciation des CSPs humaines en plaque 384 puits permettant l'analyse systématique de l'impact d'un nombre quasi illimité de conditions de différenciation. L'étude de l'action combinatoire des voies de signalisation WNT, FGF, AR a permis d'identifier les conditions propices à la formation de progéniteurs spinaux. La combinaison des voies activées par WNT, FGF, AR et SHH, nécessaires à la formation des MNs chez la souris et le poulet, a révélé que la voie Wnt activée précocement dès le stade CSP permet de générer des progéniteurs exprimant CDX2 et des gènes *HOX* correspondant à la moelle épinière antérieure (*HOXA4* et *5*). Ces progéniteurs pouvant être différenciés en progéniteurs neuronaux puis en progéniteurs de MNs sous l'influence de l'acide rétinoïque et d'un agoniste de la voie SHH. Le faible taux de progéniteurs de MNs donnant des MNs post-mitotiques a toujours été une barrière dans la formation efficace et rapide d'un protocole de différenciation de CSP en MNs spinaux. Via un criblage des molécules sur les cultures de progéniteurs de MN spinaux, l'équipe a identifié la molécule DAPT, un inhibiteur de la voie NOTCH, permettant de forcer la conversion des progéniteurs de MNs en MNs post-mitotiques. La conversion forcée de ces progéniteurs par inhibition de la voie NOTCH génère, avec une efficacité (en moyenne 74% des cellules totales) et une rapidité (14 jours) sans précédent des MNs spinaux. En dépit de cette rapidité, ces neurones acquièrent des propriétés fonctionnelles de réponse aux signaux de guidage axonal, une signature électrophysiologique de neurones matures et

répondent aux neurotransmetteurs. Ces études montraient qu'il était donc possible d'améliorer grandement la spécification des CSEh en MN spinaux, en contrôlant les morphogènes et en récapitulant les séquences de développement. Aussi, en parallèle d'une autre étude (Gouti et al., 2014), cette étude révélait la possibilité de générer sous l'influence de la voie WNT, des progéniteurs humains ayant certaines des caractéristiques de progéniteurs axiaux donnant naissance à la moelle épinière brachiale jusqu'à lombaire. Ceci en contraste des précédentes études sur la spécification des MNs humaines à partir de CSPh.



**Figure 29 : Etape de différenciation des MNs spinaux à partir de CSPh selon le protocole développé par Maury et al., 2015**

L'exposition des CSPh à un agoniste de la voie WNT(CHIR99021) et aux inhibiteurs de la voie BMP (LDN) et TGF- $\beta$  (SB) permet de spécifier des cellules CDX2+ et SOX2+ correspondant *in vivo* aux cellules PNM et aux progéniteurs du tube préneural. L'AR et l'agoniste de Sonic hedgehog (SAG) permettent la spécification des progéniteurs neuronaux et d'établir une spécification de l'identité cellulaire reproduisant l'équivalent de la spécification sur l'axe D-V de la moelle épinière pour spécifier ensuite en progéniteurs MNs au cours du temps. L'inhibition de la voie Notch par le DAPT permet la sortie des MNs du cycle cellulaire et la formation de MNs post-mitotiques.

La précision de cette différenciation ciblée permet donc une étude systématique des mécanismes gouvernant, aux différentes étapes, la spécification des sous types de MNs. En effet, il est facile de moduler un seul paramètre d'exposition des cellules à un facteur extrinsèque pour étudier son impact dans la spécification R-C des MNs. La précision de cette différenciation ciblée permet donc une étude systématique des mécanismes gouvernant, aux différentes étapes, la spécification des sous types de MNs. En effet, il est facile de moduler un seul paramètre d'exposition des cellules à un facteur extrinsèque pour étudier son impact dans la spécification R-C des MNs.

Conclusion :

L'accessibilité des différenciations *in vitro* des CSE et l'émergence des CSPi permettent d'étudier et disséquer des phases du développement embryonnaire humain encore inaccessibles jusque-là. Dans notre cas, la spécification des MNs à partir de CSP a été développée par plusieurs laboratoires. Cependant, le temps de culture, le taux d'efficacité et l'absence de caractérisation de l'identité R-C des MNs générés a limité la compréhension des mécanismes impliqués dans la spécification de ces cellules. A partir du protocole développé par Maury et al., 2015 il est possible de récapituler de manière efficace les différentes étapes menant des CSPh aux progéniteurs précoces puis aux MNs. Ouvrant la porte à une étude des mécanismes contrôlant la formation de l'axe R-C et des différentes populations de MNs.

## II. Objectifs

La mise en place des réseaux neuronaux dépend au cours du développement de la spécification de plusieurs milliers de types neuronaux distincts. Un des exemples les mieux décrit chez le poulet ou la souris de cette relation entre topographie, diversification, et établissement de circuits distincts est la formation du système moteur. Au cours du développement, correspondant à la diversité musculaire, des centaines de sous-types de motoneurones (MNs) sont générés à différentes positions le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière. La formation de cette diversité des MNs est dépendante de la mise en place des domaines d'expression des gènes HOXs qui gouvernent en combinatoire l'instruction des propriétés des MNs. Cette mise en place a lieu lors de l'élongation axiale de la moelle épinière à partir de progéniteurs neuromésodermaux qui activent séquentiellement les gènes *HOX* tout en se différenciant progressivement pour donner naissance à des régions de plus en plus caudales et donc à des populations distinctes de MNs. Les mécanismes conduisant aux changements de compétence des progéniteurs au cours du temps et en particulier à l'activation séquentielle des gènes *HOX* restent mal connus même dans les modèles animaux. De plus, comme décrit dans l'introduction, la plupart de nos connaissances sur toutes ses étapes conduisant à la genèse des différents types de MNs proviennent d'études réalisées dans des modèles animaux et peu de choses sont encore connues chez l'Homme. Le but de ma thèse a donc été de générer des modèles *in vitro* basés sur la différenciation des cellules souches pluripotentes humaines pour déterminer 1) s'il était possible de générer des progéniteurs axiaux humains. C'est-à-dire des progéniteurs capables de donner naissance à différentes populations de motoneurones se trouvant dans régions distinctes le long de l'axe rostro-caudal. 2) quels étaient les mécanismes gouvernant les changements de compétences des progéniteurs axiaux pour donner naissance à ces différents types de neurones et enfin 3) était-il possible de manipuler les mécanismes contrôlant la compétence des progéniteurs pour contrôler précisément la spécification de MNs encore inaccessibles à l'heure actuelle.

Pour ce faire je me suis basé sur les travaux initiaux des équipes qui avait découvert la possibilité de générer des progéniteurs semblant avoir des caractéristiques des progéniteurs axiaux puisque donnant naissance à des motoneurones de manière efficace (Maury et al, 2015). Cependant ces progéniteurs et les MNs en dérivant avaient été peu étudiés ; du point de vue de leur compétence pour les progéniteurs ou de leur identité rostro caudal pour les MNs. Ceci était en parti lié à l'absence de connaissance des patrons d'expression des facteurs de transcription HOXs ou encore des marqueurs de colonnes ou de pools de MNs dans la moelle humaine. Ce problème résultait, entre autres, de l'absence de caractérisation à partir d'anticorps capables de reconnaître sélectivement ces différentes protéines dans des cellules humaines. Dans un premier temps, j'ai donc validé des anticorps contre

plusieurs protéines HOX exprimés dans des populations particulières de MNs chez la souris ainsi que des anticorps contre des marqueurs de colonnes et de pools. J'ai ensuite caractérisé leurs profils d'expression dans les MNs sur des coupes d'embryons humains. Ceci m'a permis de définir des combinaisons de facteurs de transcription marquant des populations de MNs présentes à différents niveaux rostro-caudaux de la moelle épinière. Fort de ces outils, j'ai combiné des approches transcriptomiques, de la pharmacologie, des études quantitatives basées sur des analyses d'image automatisées pour étudier la compétence des progéniteurs dérivés de CSPh donnant naissance aux motoneurones et les mécanismes gouvernant la spécification des différents types de MNs spinaux.

### III. Résultats

## **Extrinsic control of human axial progenitor temporal patterning and motor neuron subtype specification**

**Abbreviated title:** human axial progenitors temporal patterning

**Authors:**

Vincent Mouilleau<sup>1,2,3,4</sup>, Célia Vaslin<sup>1,2,3</sup>, Simona Gribaudo<sup>1,2,3</sup>, Nour Nicolas<sup>7</sup>, Rémi Robert<sup>1,2,3</sup>, Margot Jarrige<sup>4</sup>, Angélique Terray<sup>1,2,3</sup>, Léa Lesueur<sup>4</sup>, Gist Croft<sup>5</sup>, Mathieu Daynac<sup>1,2,3</sup>, Virginie Rouiller-Fabre<sup>7</sup>, Hynek Wichterle<sup>5</sup>, Vanessa Ribes<sup>6</sup>, Cécile Martinat<sup>4</sup>, Stéphane Nedelec\*<sup>1,2,3</sup>

**Affiliations :**

<sup>1</sup> Institut du Fer à Moulin, 75005, Paris, France

<sup>2</sup> Inserm, UMR-S 1270, 75005 Paris, France

<sup>3</sup> Sorbonne Université, Science and Engineering Faculty, 75005 Paris, France

<sup>4</sup> I-STEM, UMR 861, Inserm, UEVE, Corbeil-Essonnes, France,

<sup>5</sup> Departments of Pathology and Cell Biology, Neuroscience, and Neurology, Center for Motor Neuron Biology and Disease, Columbia Stem Cell Initiative, Columbia University Medical Center, New York, NY 10032, USA

<sup>6</sup> Institut Jacques Monod, UMR7592, CNRS, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>7</sup> Laboratory of Development of the Gonads, Unit of Genetic Stability, Stem Cells and Radiation, UMR 967, INSERM, CEA/DSV/iRCM/SCSR, Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay aux Roses F-92265, France

\* Corresponding author: Stéphane NEDELEC

E-mail: stephane.nedelec@inserm.fr

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest

**Acknowledgements:** This project was supported by grants from AVENIR/ATIP, Association Française contre les Myopathies (AFM) and Laboratoire d'Excellence (Labex) Biopsy and Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73 and 11-LABX-0035, respectively). VM has been supported by a fellowship from Domaine d'investissement majeur (DIM) "Biothérapies" of the region Ile-de-France and a fellowship from the foundation pour la recherche médicale (FRM). C.V. is supported by a PhD fellowship of the French Ministry of Research. We thank Frédéric Causeret for providing section of mouse embryos. We thank Susan Morton and Tom Jessell for providing guinea pig anti-HOXA5 antibody, Jeremy Dasen for the guinea-pig anti-HOXC9 antibody. Imaging experiments were carried out at ISTEM and at the Imaging platform of the Institut du Fer a Moulin, Paris, France

## **ABSTRACT**

During embryogenesis, the spinal cord is progressively generated, from early born cervical to late born sacral segments, by axial progenitors. These progenitors change fate over time as demonstrated by a progressive temporal activation of posterior *HOX* genes that orchestrate rostro-caudal patterning. Whether the temporal patterning of the progenitors including *HOX* sequential induction is paced by an intrinsic clock or by extrinsic patterning signals remains poorly understood in animals let alone in human. We generated axial progenitors from human pluripotent stem cells that, while aging, progressively give rise to spinal motor neuron subtypes born later and located more posteriorly in the human embryonic spinal cord. Transcriptomic analysis of aging progenitors demonstrates that the temporal induction of posterior *HOX* genes is paralleled by a progressive increase in FGF ligands and FGF target genes. Blocking endogenous FGF signaling stalled the induction of caudal *HOX* genes, while a precocious increase in FGF, alone or combined to GDF11, induced posterior *HOX* genes and subsequently late born caudal motor neurons at the expense of early born ones. Hence, our results highlight that axial patterning do not rely on an intrinsic timing mechanism instead their temporal patterning is paced by the sequential exposure to secreted factors, providing access to precisely engineered human spinal cord cells of defined rostro-caudal subtype identities.

## **INTRODUCTION**

The nervous system is composed of thousands of different neuronal subtypes generated from limited pools of progenitors. This vast cellular diversity largely arises from progenitors that go through stereotypical temporal transitions in fate to sequentially generate distinct neuronal identities (Kohwi and Doe, 2013; Oberst et al., 2019a; Rossi et al., 2017). In invertebrates the temporal patterning of progenitors is largely controlled by intrinsic temporal sequences of transcription factors (Kohwi and Doe, 2013; Rossi et al., 2017). In vertebrates, data also supports that temporal sequences are ordered and paced by intrinsic mechanisms, yet cell extrinsic factors have been shown to play a critical role in regulating the process in different systems (Dias et al., 2014; Gaspard et al., 2008; Kohwi and Doe, 2013; Oberst et al., 2019a; Shen et al., 2006; Tiberi et al., 2012a). However, the relative role of intrinsic and extrinsic mechanisms as well as the nature and source of the extrinsic factors often remain unknown. This not only limits our understanding of temporal fate patterning mechanisms but also precludes the efficient engineering of neuronal subtypes from human pluripotent stem cells

(hPSC). Here, we address this question in the context of the temporal generation of human motor neuron subtypes from spinal axial progenitors.

In amniotes, spinal neuronal diversity, that ensures sensory and motor functions, is progressively generated from early born cervical to late born sacral/coccygeal segments during the axial (rostro-caudal) elongation of the embryo. In mouse and chick, this elongation is fueled by the continuous generation of neural progenitors from axial progenitors located in the caudal stem zone of the developing embryo (Henrique et al., 2015; Wilson et al., 2009a), (Cambray and Wilson, 2007; Tzouanacou et al., 2009). Clonal analysis indicate that individual axial progenitors self-renew while sequentially specifying neuronal and mesodermal progenies located at progressively more caudal levels of the axis over time (Cambray and Wilson, 2002; Forlani et al., 2003; Mathis and Nicolas, 2000; Tzouanacou et al., 2009; Wymeersch et al., 2016a).

One of the most striking examples of this temporal cell diversification is the generation of hundreds of motor neuron subtypes that innervate the different muscles of the body. Motor neuron rostro-caudal diversification is instructed by HOX transcription factors encoded by 39 genes organized into four different genomic clusters (*HoxA, B, C, D*). Several HOX genes located in the middle and 5' part of the *HoxA, C* and *D* (but not *B*) complexes display collinear regionalized expression in registry with the major spinal subdivisions in which they orchestrate interneuron and MN subtypes (Baek et al., 2017; Philippidou and Dasen, 2013; Sweeney et al., 2018). The regionalized expression of *HOX* genes is initiated by the progressive induction of more and more 5' *HOX* genes in the caudal stem zone ; including in presumptive neuromesodermal progenitors (NMPs) as shown by recent transcriptomic studies (Deschamps and Duboule, 2017; Gouti et al., 2017; Wymeersch et al., 2019) . However, the mechanisms pacing axial progenitor temporal fate patterning including *HOX* gene induction remain largely unknown. While it has been proposed that axial progenitors harbor an intrinsically controlled clock, grafting experiments in chick showed that a transfer of old progenitors to a younger stem zone reset the old Hox pattern to a young one (Del Corral and Storey, 2004; McGrew et al., 2008; Wymeersch et al., 2019) suggesting that environmental factors might play a role in regulating *HOX* gene expression in axial progenitors. In agreement, the WNT, FGF, RA and BMP signaling molecules, that are produced by multiple cell types in the caudal embryonic region, have all been implicated in *HOX* gene induction. However, they also control axial elongation, the specification and maintenance of axial progenitors as well as their differentiation toward mesodermal or neural fate (Del Corral and Storey, 2004; Liu et al., 2001;

Mazzoni et al., 2013; Novitch et al., 2003; Wilson et al., 2009b). These overlapping roles and the interplays between the pathways in embryos have so far hindered whether these factors play a permissive role allowing an intrinsic clock to proceed or whether they instruct the changes in axial progenitor identity. *In vitro* differentiation of pluripotent stem cells provides an experimentally accessible system to study the transition from pluripotency to lineage restriction and contribution of individual signaling pathways to this process. It also provides a unique opportunity to study patterning in human development. Axial neuromesodermal progenitors have been produced by the exposure of adherent mouse and human pluripotent stem cells (PSC) to a combination of Wnt and FGF (Denham et al., 2015; Edri et al., 2019; Frith et al., 2018; Gouti et al., 2014; Tsakiridis et al., 2014; Turner et al., 2014). While the temporal activation of *HOX* complexes was reported in some cases, the underlying mechanisms remain unknown (Gouti et al., 2014; Lippmann et al., 2015).

Here, we defined, in the human embryonic spinal cord, combinations of transcription factors, including HOXs, which distinctly identify spinal MN subtypes found at various rostro-caudal positions. Using MN subtype specification as readout we demonstrate the specification of axial progenitors from hPSCs. They undergo time dependent changes as demonstrated by the generation of more and more caudal MN subtypes as progenitor age. Using transcriptomic analysis and pharmacology experiments we demonstrate that FGF signaling endogenous to the axial progenitors controls *HOX* collinear temporal activation. A precocious increase of FGF alone or together with GDF11, another extrinsic cue, shortens the temporal sequence leading to the rapid induction of 5' caudally expressed *HOX* genes in axial progenitors and the specification of late born caudal MNs at the expense of early born ones within the same time frame. Manipulations of the pacing pathways allow the precise synchronous engineering of human cell types normally born at distinct stages of development, a strategy that might be applicable beyond spinal cord specification.

## RESULTS

### Characterization of spinal motor neuron diversity in human embryos

In order to assess the mechanisms controlling hPSC-axial progenitor rostro-caudal potential we first defined combinations of transcription factors identifying MN subtypes located at different rostro-caudal levels in the human embryonic spinal cord (Fig.1 and S1). We characterized the expression profile of transcription factors previously shown to identify distinct MN populations in mouse and chick spinal cords (Dasen and Jessell, 2009) (Fig. 1 and S1). We monitored the

expression of ISL1 and HB9, two motor neuron markers, as well as HOX, FOXP1 and SCIP transcription factors in human fetal spinal cord sections at 6.3 and 7.5 gestation weeks. Our analysis revealed that the cervical region (vertebrae C1-C4) is characterized by the presence of HOXA5 and HOXC5 motor neurons. The brachial region (C5-C8) is subdivided in two domains: the anterior part contains HOXC6 motor neurons while the caudal part contains motor neurons co-expressing HOXC6 and HOXC8 (HOXC6/C8) motor neurons co-expressing HOXC8/C9 start at the transition between brachial and thoracic segment and extend up to the mid-thoracic region until HOXC9/D9 motor neurons are observed. The lumbar region is characterized by HOXD9/C10 motor neurons (Fig. 1, S1A). Foxp1 motor neurons correspond to brachio/thoracic and lumbar limb-innervating motor neurons as well as thoracic preganglionic motor neurons in mouse. FOXP1 motor neurons were also observed in these domains in human. As in mouse, motor neurons expressing high level of FOXP1 (FOXP1<sup>high</sup>) formed a lateral motor column (LMC) in the brachio/thoracic and lumbar spinal cord where limb innervating motor neurons are located (Fig.1A-B and S1A-C). Inside the LMC, FOXP1/SCIP motor neurons are located in the caudal brachial and anterior thoracic regions (Fig.1, S1C). The brachial population expressed HOXC8 but not HOXC9. The thoracic population co-expresses both and might thus identify the hand innervating motor neurons as this TF code identify forepaw-innervating motor neurons in mouse (Mendelsohn et al., 2017) (Fig. 1, S1C-D). Importantly, HOXs do not reach the same boundaries of expression in neuronal population outside motor neurons demonstrating the importance of single cell analysis gated to a defined cell types to interpret positional identities. Overall, MN subtypes located at distinct rostro-caudal positions can be identified by combination of multiple transcription factors providing readouts to assess the identity of *in vitro* generated motor neurons and the mechanisms controlling rostro-caudal patterning.

### **Motor neuron subtype specification demonstrates the generation of axial progenitors that undergo temporal fate patterning**

To investigate mechanisms controlling rostro-caudal patterning of human spinal cord we examined effects of caudalizing patterning signals on the differentiation of human pluripotent stem cells (hPSCs) into spinal motor neurons. We previously reported that exposure of hPSC-derived embryoid bodies to inhibitors of the TGF $\beta$  and BMP receptors (LDN193189 and SB431542) and a Wnt pathway activator (CHIR99021) led to the generation of progenitors expressing CDX2, a marker of the caudal stem zone containing the axial progenitors, and some

HOX genes (Maury et al., 2015). The progenitors were then converted in neurons (95% of the cells) and spinal motor neurons (75% of the cells) following exposure to RA and a Smoothed agonist (SAG) on day 2 or on day 4 of differentiation. However, in absence of properly characterized markers, the subtype identity of the motor neurons generated was not determined. We thus compared the identity of the motor neurons generated in these two conditions to motor neurons generated upon addition of RA and SAG but in absence of Wnt activation previously shown to acquire a typical cervical identity (HOXA5) (Amoroso et al., 2013). As expected, differentiation of human embryonic stem cells (hESC), in presence of RA/SAG led to the generation of motor neurons expressing HOXA5 and HOXC5 but none of the other HOXs (Fig. 2A-B). In contrast, Wnt activation followed by RA at day 2 or 4 (D2 or D4) gave rise to motor neurons displaying a more caudal identity (Fig. 2 A-B). Some HOXC6 motor neurons were observed upon RA D2, while RA D4 led to the generation of HOXC6/C8 motor neurons (Fig. 2B) which identify caudal brachial motor neurons in human embryos. Hence, RA on day 2 or on day 4 specifies motor neurons of different rostro-caudal identities. These results suggest that 1) Wnt activation specifies axial progenitors capable to give rise to distinct rostro-caudal levels 2) the duration of RA signaling (here, 7 versus 5 days) or the day at which the progenitors are exposed to RA (day 2 or 4) might control rostro-caudal patterning and MN subtype diversification. However, it was not possible at this point to determine whether 1) the same progenitors could be driven to distinct fates depending on how long they were submitted to RA, or 2) if D4 progenitors intrinsically differed from D2 progenitors, leading to distinct fates upon RA treatment, however long it may last.

To distinguish between these two possibilities, we systematically delayed the moment at which the progenitors were exposed to RA (day 2 to 7) or exposed them to different RA duration (2, 5 or 6 days) (Fig 2C, S2). Motor neurons were efficiently generated in all conditions as shown by the coexpression of HB9, ISL1 and the pan neuronal marker Neurofilament light chain (Fig. 2D and S2A, B). Reducing RA duration (2, 5 or 6 days) did not promote the specification of more caudal motor neurons (Fig. S2C). In contrast, delaying the day at which the progenitors received RA led to the specification of progressively more caudal motor neurons in both human embryonic stem cells (hESC) (Fig. 2C-F). RA D3 generated motor neurons acquiring mostly an anterior brachial identity (75.3% HOXC6 and 18.2% HOXC6/C8-coexpressing motor neurons) while RA D4 generated motor neurons with a caudal brachial (41.8% HOXC6/C8) or an anterior thoracic identity (19,2% HOXC8/C9) (Fig. 2D-F, S2E). When RA was further delayed, anterior brachial motor neurons (HOXC6) were replaced by anterior thoracic motor

neurons (HOXC8/C9) (Fig. 2D-F). To determine whether motor neurons acquired columnar and pool identities in agreement with their HOX code, we quantified FOXP1<sup>high</sup> and SCIP/FOXP1<sup>high</sup> motor neurons which identify respectively all LMC motor neurons and a subset of them located in the caudo-brachial/anterior thoracic spinal cord in human embryos (Fig. 1A-B, Fig. 2D). LMC FOXP1<sup>high</sup> motor neurons were mostly observed in RA D4 and D5 conditions (Fig 2D, G). HOXC9/FOXP1/SCIP motor neurons located in the anterior thoracic spinal cord in human and corresponding to digit innervating motor neurons in mouse were observed almost exclusively in the RA D5 condition (Fig. S2F). Finally, while displaying a similar HOX code (HOXC8/C9), RA D5, D6 or D7 conditions generated distinct MN subpopulations. Later RA led to more caudal identities as demonstrated by the loss of FOXP1<sup>high</sup> motor neurons in the two last conditions (Fig. 2D, 2G, S2D). We then verified whether these results could be extended to the differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSC). When applying the same protocol, (CHIR 3 $\mu$ M followed by RA and SAG) we observed that motor neurons were efficiently generated in all conditions but express little caudal HOXs (not shown). This correlated with a reduced induction of axial progenitors as demonstrated by the patchy induction of CDX2 on day 3 of differentiation. Increasing, CHIR to 4  $\mu$ M induced CDX2 in all cells (Fig. S2G), then, a progressive delay in RA exposure led to the efficient specification of motor neurons harboring more and more caudal identities (Fig. S2H).

Overall, Wnt activation combined to TGF- $\beta$ /BMP pathway inhibitors generates progenitors that can be differentiated selectively toward the neuronal lineage to give rise to neuronal populations with discrete rostro-caudal identities depending on the time at which they are exposed to RA. These progenitors hence qualify as axial progenitors that undergo changes in their rostro-caudal potential over time raising the question of the underlying mechanisms.

### **Parallel induction of caudal *HOX* genes and FGF target genes in aging axial progenitors**

To determine the gene expression changes occurring during the temporal patterning of the progenitors we performed a transcriptomic analysis of hPSC cells and Wnt-induced axial progenitors on day 2, 3 and 4 of differentiation (Fig. 3A). Pathway analysis (Reactome) of the genes enriched in D2 or 3 progenitors in comparison to hPSC indicated an activation of the Wnt pathway in agreement with the addition of CHIR, major changes in genes implicated in chromatin remodeling and the transcriptional activation of HOX genes (Fig. S3). At all time-points, analysis of the most enriched genes in comparison to hPSC demonstrated that the hPSC derived axial progenitors harbored a transcriptomic signature highly similar to the caudal lateral epiblast in which axial progenitors reside in mouse (expression of *CDX1* and 2, *T*, *FGF17*,

*RXRG*, *SP5/8*, *WNT5A/B*, *WNT8A*, *FGF8*, *GRSF1*, *CYSTM1*, *HES3* together with *SOX2* and *OCT4*; a loss of other pluripotency markers and the absence of typical markers of node cells, mesodermal and allantois Fig. 3B) (Cambray and Wilson, 2007; Edri et al., 2019; Gouti et al., 2014, 2017; Henrique et al., 2015; Koch et al., 2017; Wymeersch et al., 2016b, 2019). In agreement, among the 142 genes characterizing early (E8,5) and late (E9,5) mouse NMPs recently defined by single cell RNA sequencing, 122 were expressed by day 2, 3 or 4 progenitors (Fig. 3C) (Gouti et al., 2017). In addition, as observed in hES-derived axial progenitors giving rise selectively to thoracic neural crest (Frith et al., 2018), D2-4 progenitors expressed low levels of *PAX3*, *ZIC2,3,5*, *SOX9*, and *MSX1-2* as well as *SOX1-3*, *OLIG3*, *MEIS2*, *CDH2*, a series of genes associated with an engagement toward neural differentiation (Frith et al., 2018; Gouti et al., 2017; Koch et al., 2017). Immunostaining of D2 hES- or iPSC-derived progenitors confirmed the coexpression of *SOX2*, *CDX2* together with *TBXT*; the latest decreasing between D2 and D3 (Fig. 3D, S3B). Overall, the transcriptomic signature of the cells together with the low level of *TBXT* detected by immunostaining and the absence of typical neural markers (*PAX6*, *HES5*, *RAR-β*, *NEUROG1-3* activated only after RA; (Maury et al., 2015) and data not shown) demonstrate that the hPSC-derived axial progenitors resemble mouse NMP cells “en route” toward neural differentiation (Edri et al., 2019; Koch et al., 2017; Liu et al., 2001; Wymeersch et al., 2016b).

We then sought to determine the changes occurring during progenitor temporal patterning by comparing the transcriptomes of D2, 3, and 4 progenitors. First, we detected a sequential activation of *HOX* genes over time (Fig. 3E). 16 *HOX* genes were expressed at day 2; all belonging to the 3' half of *HOX* complexes with anterior borders of expression in the hindbrain or cervical spinal cord (Fig. 3E). At day 3, a second group was induced (*HOXA6*, *A7*, *C8*, *C9*, *D4* and *D9*) which correspond to genes centrally located in *HOX* complexes with expression domains in the brachial and thoracic spinal cord. At day 4, *HOXC8* and *HOXC9* expression was increased (3,8 and 3,4 fold respectively) in agreement with the increase in *HOXC8* and *HOXC9* motor neurons upon RA/SAG addition at this stage (Fig 3E, 2G). The non-expressed *HOXs* corresponded largely (13 genes) to the 10 to 13 paralog groups, the latest and most caudally expressed *HOXs* induced in the tail bud in the mouse.

To define the pathways activated over time in parallel to *HOX* gene induction, we performed pathway analysis (Reactome) on the differentially expressed genes between progenitor stages. Comparison of D2 and D3 progenitors indicate a statistically significant enrichment for six annotations (Fig 3F). Two of them indicating a temporal increase in the activity of the Mitogen-

activated protein kinases (MAPK) pathways as shown by the progressive induction of typical target genes of these pathways (*ETV5*, *DUSP4*, *DUSP6* and *SPRY2* genes) (Fig. 3G). This rise in MAPK target genes is paralleled by a gradual increase in the expression of *FGF8* and *FGF17* genes as described in the caudal epiblast of chick embryos (Fig 3G) (Liu et al., 2001; Wymeersch et al., 2019).

Hence, hPSC-derived axial progenitors display a sequential activation of *HOX* complexes paralleled by an increase in expression of FGF ligands and of MAPK pathway target genes (Fig. 3H). As FGFs has been shown to regulate *Hox* gene expression in other systems (Bel-Vialar et al., 2002; Dasen et al., 2003; Liu et al., 2001) and MAPKs are classic intracellular mediators of FGF signals these results suggest that FGFs might pace axial progenitor temporal patterning including *HOX* complexes induction.

### **Endogenous FGF signaling is necessary for the temporal shift in progenitor identity**

To determine whether FGF signaling endogenous to the progenitors participates to the temporal shift in progenitor fate we sought to inhibit FGF receptors and the MAPK pathway in aging axial progenitors. We exposed from day 3 to day 7 differentiating progenitors to 1) PD173074, a selective FGFR1/3 antagonist and 2) PD0325901 which inhibit MEK1/2, two kinases downstream of FGF signaling in many systems including in the caudal stem zone (Lunn et al., 2007). Then at day 7, progenitors were exposed to RA/SAG and MN rostro-caudal identity was evaluated on day 14 (Fig. 4A). First, the efficiency of MN generation was not impacted by the inhibitors (Fig. S4). However, while in control conditions D7 RA/SAG induced motor neurons with anterior thoracic identity (*HOXC8* and *C9*), in presence of the inhibitors motor neurons acquired an anterior brachial identity (*HOXC5* and *C6*) (Fig. 4 A-C). These correspond to the MN identity of the motor neurons born upon RA/SAG at day 3 (the day at which the inhibitors were applied); an identity of motor neurons born earlier during embryonic development.

To determine whether this dissociation between the age of the progenitors and the identity of the progenies was linked to a stalled sequence in caudal *HOX* gene induction in axial progenitors we performed realtime PCR to detect *HOXC6*, *C8* and *C9* mRNAs in D4 and D5 progenitors in absence or following the addition of the MEK inhibitor. While in control condition, *HOXC6*, *C8* and *C9* genes increased between day 3 and day 4 (respectively 4,01 fold, 4,26 fold and 13,14 fold) the addition of the MEK inhibitor blocked the induction of the three genes while *HOXA5* expression was not modified (Fig. 4D).

Hence, inhibition of FGF signaling blocks *HOX* gene temporal induction and stalled the temporal changes in the rostro-caudal potential of axial progenitors. This leads to a decorrelation between the age of the progenitors and the identity of the progenies as demonstrated by the specification from day 7 progenitors of MN subtypes normally generated from day 3 progenitors and born earlier during embryogenesis. Altogether, these results demonstrate that intrinsic paracrine FGF/MAPK signaling is necessary for the temporal patterning of axial progenitors including the temporal activation of *HOX* complexes.

### **FGF level paces axial progenitor temporal patterning and caudal MN specification**

hPSC-derived axial progenitors express different FGF ligands and our transcriptomic analysis of aging axial progenitors identified a temporal increase in FGF target genes as well as an increase in *FGF8* and *FGF17* expression. These results suggest that the temporal identity changes might be regulated by the duration during which the progenitor receive FGFs prior differentiation and/or the increase production of FGF ligands. To distinguish between these possibilities and test whether modulating FGFs was sufficient to change progenitor rostro-caudal potential, we tested the impact of a precocious increase in FGF2 on MN subtype specification. Early D3 progenitors, that normal give rise to anterior brachial motor neurons were exposed, together with RA, to FGF2 for different durations (24h, 48h or 144h) or at different concentrations (15, 60, 120 ng/ml). In all conditions, motor neurons with a more caudal identity, which are born later in development, were produced (Fig. 5, S5A-B.). Addition of 120 ng/ml FGF2 for 24h induced mostly motor neurons with a caudal brachial identity as shown by the 10-fold increase in HOXC8 motor neurons (79,4%) and the appearance of FOXP1<sup>high</sup>/SCIP motor neurons (47,9%) and motor neurons (14,7%) (Fig. 5A-C, S5C-F). After 48h of FGFs, motor neurons with a more caudal, mid-thoracic, identity were specified as demonstrated by the decrease in HOXC6 motor neurons (7,5%) paralleled by an increase in HOXC9 motor neurons (5.2-fold, 76,4%) and a decrease in FOXP1<sup>high</sup>/SCIP motor neurons. After 144h of FGF2, the motor neurons acquired a slightly more caudal identity (66,9% HOXC8/C9 motor neurons with a further disappearance of HOXC6 (1,8%) and FOXP1<sup>high</sup>/SCIP motor neurons (Fig 5A-C, S5C-D). A result confirmed with FGF8 showing that different FGFs can mediate the change in axial potential of the cells (Fig. S5H). We then assessed the impact of modulating the concentration for a constant duration (Fig. 5D, S5G) 15 ng/ml FGF2 for 144h was sufficient to induce HOXC8 motor neurons (68,2%) but not HOXC9 while 60 ng/ml induced HOXC8/HOXC9 motor neurons (58,9%) (Fig. S5G).

To determine whether these changes in axial potential of the progenitors correspond to acceleration in the temporal induction of *HOX* genes we performed realtime PCR analysis 24h and 48h post FGF2 treatment. After 24h and 48h, FGF2 (120 ng/ml) led to a precocious increase in *HOXC8* (32.70 fold and 185.22 fold), *HOXC9* (7.63 and 155.42 fold) and *HOXD9* (1.42 and 29.81 fold increase) mRNAs (Fig. 5E).

Overall, these results demonstrate that modulating FGF level is sufficient to pace, in a concentration and/or duration dependent-manner, *HOX* gene induction and the axial potential of the progenitors. A precocious increase in FGF signaling then results in the specification, from early progenitors, of motor neurons normally born late in development at the expense of early born ones.

### **FGF and GDF11 synergize to further accelerate axial progenitor temporal patterning and promote late born lumbar motor neuron specification**

FGF2 seems to promote changes in axial progenitor temporal identity to generate spinal segments up to the mid-thoracic domain as *HOXD9* and more caudal motor neurons were never observed. This raises the question on whether other factors can further accelerate axial progenitor temporal patterning or whether the most caudal segments emerge from different type of progenitors. GDF11 is a member of the TGF $\beta$  family implicated in the control of axial elongation, is implicated in caudal *HOX* gene induction and in MN subtype specification (Aires et al., 2019; Gaunt et al., 2013; Lippmann et al., 2015; Liu, 2006; Liu et al., 2001; McPherron et al., 1999; Peljto et al., 2010). It has been proposed that it regulates the most 5' *HOX* gene starting from the 10 paralogs including in presumptive NMP like cells (Aires et al., 2019; Lippmann et al., 2015). In addition, GDF11 control the change in competence of retinal progenitors (Kim et al., 2005). We thus exposed day 3 progenitors to a combination of RA and GDF11 (25 ng/ml) for 24h, 48h or 144h (Fig. 6, S6). As for FGF2, a 24h treatment induced anterior thoracic motor neurons (*HOXC8*, 58,7 % and *HOXC9*, 41,0 %) and their number increased after a 48h or a 144h treatment (58.9% and 61,7% *HOXC9* motor neurons; Fig 6A,B, S6A). However, GDF11 did not induce more caudal motor neurons. In chick, a synergy between FGF2 and GDF11 has been previously reported to promote thoracic and a small fraction of lumbar motor neurons (Liu et al., 2001). We thus tested the effect of a combination of FGF2 (120 ng/ml) and GDF11 (25 ng/ml) on day 3 of differentiation (Fig. 6A, B, S6B-E). *HOXC9* (65.4 fold change) and *HOXD9* (2774.77 fold change) mRNAs were already observed 24h post treatment. Their expression further increased 48h post-treatment (Fig. 6C). In agreement, 24h

FGF2/GDF11 induced HOXC9 MNs (88,2 %) and HOXD9 motor neurons (46,7%) on day 14; A 48h treatment lead to the appearance of lumbar HOXC10 motor neurons (11,1%) which represented 36,9% of the motor neurons on day 14 after 144h of FGF2/GDF11 (Fig. 6A, D).

Overall, our results show that GDF11 also modulate the tempo of axial progenitor temporal patterning. In agreement with the defects in cervical vertebrae observed in the GDF11 knockout and the anterior shift of HOXC6 and HOXC8 expression following GDF11 electroporation in the chick spinal cord, GDF11 can promote the specification of brachial and thoracic segment from hPSC-derived progenitors. It promotes more caudal segments only in synergy with an increase in FGF signaling leading to a precocious induction of caudal *HOX* genes and the subsequent specification of late born lumbar HOXC10 motor neurons at the expense of early born ones. Hence, early axial progenitors are competent to produce the different spinal segments from brachial to lumbar. The changes in their rostro-caudal potential does not dependent on an intrinsic mechanism but it is rather controlled by extrinsic factors that differentially regulate *HOX* gene induction.

## Discussion

This study reports the generation human axial progenitors from pluripotent stem cells and the mechanisms underlying their temporal patterning. We show that the temporal change in axial progenitor identity as illustrated by the sequential activation of caudal *HOX* genes is not controlled by intrinsic mechanisms but rather by the sequential exposure to extrinsic factors. Manipulation of these extrinsic pathways allows the precise synchronous specification of spinal cells of defined rostro-caudal identities.

### Specification of human axial progenitors

We previously reported that Wnt signaling activation together with a dual inhibition of TGF $\beta$  and BMP pathways largely improve the differentiation of hPSC into spinal motor neurons with 75% of the cells acquiring this fate (Maury et al., 2015). Here, we demonstrate that along this very specific path of differentiation the cells transition initially through an axial progenitor stage. Indeed, we show that upon changes in FGF and GDF11 signaling, day 3 progenitors have the potential to generate MN populations found in human embryos between the brachial and lumbar levels of the spinal cord demonstrating the axial potential of these progenitors (Fig. 2, 5, 6). In agreement, beside the coexpression of SOX2 and TBXT, the hPSC-derived progenitors display a transcriptional profile highly similar to the one of mouse axial progenitors (Gouti et

al., 2017) and to hPSC-derived progenitors identified as NMPs based on the coexpression of SOX2 and TBXT. The low expression of TBXT in aging progenitors suggests that the cells might progressively switch toward a preneural fate in line with a recent report showing that mouse ES derived NMPs progressively gain neural gene expression over time (Edri et al., 2019). This state might correspond to SOX2+/TBXT<sup>low</sup> cells located in the most lateral and rostral part of the caudal lateral epiblast and the lateral border in mouse embryos (Wymeersch et al., 2016a).

### **Intrinsic FGFs pace temporal patterning and the temporal induction of *HOX* genes**

Pacing of *Hox* induction is essential for normal development but the mechanisms that regulate the tempo of their induction remained unknown (Ebisuya and Briscoe, 2018; Juan and Ruddle, 2003; Tschopp et al., 2009). Our results support a critical role for FGFs endogenous to the progenitors in pacing this sequential activation that can be further controlled by environmental FGF levels. We have shown that inhibiting FGF signaling in aging progenitors blocked temporal patterning as shown by the generation of early born cervical/anterior brachial motor neurons from old progenitors that normally give rise to motor neurons of a thoracic identity. In contrast, increasing FGF signaling promotes the precocious expression of more 5' *HOX* genes (Fig 5, S5, S7); a process further accelerated by a combination of FGF and GDF11 (Fig 6 and S6, S7). Hence, manipulating the FGF and GDF11 pathways blocks or accelerates axial progenitor temporal patterning including *HOX* temporal induction leading to the dissociation between the age of the progenitors and the generated progenies. FGFs was previously implicated in regulating caudal *HOX* genes spatial expression domains in the chick spinal cord (Bel-Vialar et al., 2002; Dasen et al., 2003). This might thus root in its ability to pace caudal *HOX* gene temporal activation. It might do so by synergizing with the transcription factor CDX2 as previously demonstrated (Mazzoni et al., 2013, Bel-Vialar et al., 2002).

This extrinsic, dynamic, control of *HOX* gene expression might explain the reprogramming of the *HOX* profile of axial progenitors upon heterochronic grafting in the stem zone. Indeed, the transfer of individual “old” axial progenitors to a ‘young’ stem zone can revert the *HOX* profile of the grafted cells to a younger one while transfer of a group of progenitors precluded this reprogramming. (McGrew et al., 2008; Wymeersch et al., 2016b). The level of environmental FGFs, including the one produced by the progenitors, at the time of the transfer might regulate the identity of the surrounding cells. This mechanism might help synchronizing the clock in neighboring cells to ensure that population of cells change identity in parallel.

This critical role for extrinsic factors in pacing temporal patterning is in line with several recent results in other temporal lineages. In the hindbrain, ventral progenitors produce first cranial motor neurons and change competence to specify serotonergic neurons, a switch mediated by TGF $\beta$  expressed both by surrounding tissues and the progenitors themselves. Furthermore, while the sequential generation of cortical neuron subtypes from cortical progenitors might be in part intrinsically controlled (Eiraku et al., 2008; Gaspard et al., 2008; Shen et al., 2006), numerous environmental factors, some produced by the progenitors themselves, play a dominant role in pacing and ordering the sequence such as FGFs or Wnt as recently elegantly demonstrated by the Jabaudon lab (Kohwi and Doe, 2013; Oberst et al., 2019a, 2019b; Rossi et al., 2017; Tiberi et al., 2012b). Altogether these results suggest that in contrast to invertebrates, in vertebrates including humans, temporal patterning might be preponderantly governed by environmental factors. In the case of the *HOXs*, this extrinsic control of their sequence of induction might facilitate tissue or species specific control of their expression profile.

### **Targeted differentiation of neuronal subtypes**

Numerous studies support the idea that the differential vulnerability of MN subtypes observed in all motor diseases is in part triggered by intrinsic differences between resistant and vulnerable populations. Approaching this question has been limited by the inability to efficiently produce the different spinal motor neurons in part due to the lack of markers to ensure the correct identification of the generated cell types (Lippmann et al., 2015; Patani et al., 2011). Our analysis of the transcriptional code identifying specific human MN population in the embryos allowed us to tackle the mechanisms underlying their specification. The experimental paradigm with established with a 3D, EB based differentiation, of human pluripotent stem cells, coupled to the manipulation of the FGF/GDF11 axis to control the temporal fate patterning of axial progenitor allows a very fine control over neuronal subtype specification with MN acquiring defined identities corresponding to specific MN pools in mouse as well as putative hand innervating motor neurons (Fig 2 and S2). Interestingly, motor neurons such as anterior brachial or lumbar motor neurons that are born at very different time-points during embryogenesis can be now generated synchronously in 14 days while keeping the efficiency of motor neurons generation. Together with our recent studies on dorsal spinal interneuron specification, our results provide a robust approach to generate the different neuronal subtypes constituting the human spinal cord for basic and translational perspectives (Duval et al., 2019; Maury et al., 2015).

Finally, our results demonstrate that temporal sequences can be manipulated for cell engineering purposes suggesting that the *in vitro* generation of late born cells such as glia which require extended protocols of differentiation could be accelerated.

## **Methods**

### **Human embryonic spinal cord slice preparation**

Human fetal embryos were obtained from pregnant women referred to the Department of Gynecology and Obstetrics at the Antoine Bécclère hospital (Clamart, France) for legally induced abortions in the first trimester of pregnancy as previously described (Lambrot et al., 2006). All women provided written informed consent for scientific use of the fetal tissues. None of the abortions were due to fetal abnormality. The fetal age was determined by measuring the length of limbs and feet (Evtouchenko et al., 1996). The project was approved by the local Medical Ethics Committee and by the French Biomedicine Agency (reference number PFS 12–002)

Alternatively, Human embryonic spinal cords were collected in accordance with the national guidelines of the United States (National Institutes of Health, U.S. Food and Drug Administration) and the State of New York and under Columbia University institutionally approved ethical guidelines relating to anonymous tissue. The material was obtained after elective abortions and was classified on the basis of external morphology according to the Carnegie stages. Gestational age was determined by last menstrual period of the patient or by ultrasound, if the ultrasound estimate differed by 1 week as indicated by the obstetrician.

In all cases, the spinal cord was removed as intact as possible before fixation with fresh, cold 4% PFA for 1.5 h on ice washed abundantly with PBS and then cryoprotected overnight in 30% sucrose. Post-fixation, the cord was measured and cut into anatomical sections to accommodate embedding in OCT Compound (Tissue-Tek) and stored at -80°C before cutting on a microtome. Sections (16 µm) were cut along the full length of the cord.

The different commercially available HOX antibodies used on human sections were first validated on mouse spinal sections. All antibodies used show expression profiles similar to the one described previously (Dasen et al., 2003; Liu et al., 2001; Mendelsohn et al., 2017) (not shown)

### **Culture of hPSC lines**

Human ESC line (SA01) were obtained from Wicell research institute and were used accordingly to the French current legislation (Agency of Biomedicine, authorization number AFSB1530532S). Induced PSCs line WTSli002-A and WTSli008-A were obtained from the European Bank for Pluripotent Stem Cells (EBISC). All PSC lines were cultured on Matrigel (corning) in mTSER1 medium (Stem Cell technologies) and amplified using EDTA based passaging. PSC were thawed in presence of Y-27632 (5 $\mu$ M, StemGent) and the culture media was changed every day. Experiments with hiPSC were approved by relevant ethic committees (declaration DC-2015-2559).

### **Differentiation**

Human PSC embryoid body based differentiation was performed as previously described (Maury et al., 2015). hPSC were dissociated with cold accutase (Invitrogen) for 3 to 4 min at 37°C and resuspended in differentiation medium N2B27 (DMEM F12 (ThermoFischer), Neurobasal medium (ThermoFischer), supplemented with N2 (Life Technologies)), B27 without Vitamin A (Life technologies). Pen-strep 1%,  $\beta$ -ME 0,1% (Life Technologies), with Y-27632 (5 $\mu$ M, STemGent), SB431542 (40  $\mu$ M, Tocris) and LDN 193189 (0,2  $\mu$ M, Miltenyi). 2x10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup> were seeded in ultra-low attachment 6 well plates (Corning) to form embryo bodies (EBs). All conditions of differentiation received the same medium at day 2 and at day 3 but SB431542 was removed at day 3. Then the differentiation proceeded according to the schema presented above the figures. Smoothened Agonist (SAG, Calbiochem), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2, Peprotech), retinoic acid (RA, Sigma-Aldrich), Growth Differentiation Factor (GDF11, Peprotech), PD0325901 (Miltenyi), PD173074, PD184352, SCH772984 (Selleckchem), DAPT (Tocris) were added at indicated time points. For concentrations see table 3. The cell media were changed every other day unless specified.

## **Immunostaining**

Embryoid bodies were collected rinsed with PBS then fixed with 4% PFA 5 min at 4°C and rinsed with PBS 3 times for 5 min. EBs were cryoprotected with 30% sucrose and embedded in OCT (Avantor) prior sectioning with a cryostat. For immunostaining, the slices are incubated with saturation solution (PBS/FBS 10 %/0,2% Triton) for 10 min, then the saturation solution is removed and primary antibodies (Table 1) were diluted in PBS/2% FBS/0,2% Triton and incubated overnight at 4 °C in a humidified chamber. Slices were washed 3 times 10 min with PBS then exposed to secondary antibodies (Alexa 350, 488, 555, 647, Thermofisher, all 1/1000) diluted in PBS/2% FBS /0,2% Triton for 1h, washed 3 times 10 min with PBS then incubated with DAPI for 10min. Slices were then covered with fluoromount and a microscopy glass slide.

## **Image acquisition**

Samples were visualized and imaged either on an inverted fluorescence microscope (Zeiss) Imager Z01 with an Axiocam MRm camera (Zeiss) with an Hamamatsu ORCA-flash 4.0 camera and a confocal scanning unit (CSU-X1-A1N-E; Camera evolve, EMCCD 512) with Zen black software (Zeiss), or with LSM-800 confocal microscope (Zeiss) with Zen software (Zeiss), or the samples are analyzed by epifluorescent microscope DM6000-2 (Leica) with coolSNAP EZ camera with metamorph software (metamorph inc). Embryoid body sections were imaged using a 20× objective and high-resolution camera mode. Acquisition of EB for each condition, include Hoechst staining (nuclei) followed by multi-wavelength acquisition of a fixed number of EBs (5–7). The images were exported, processed (contrast/brightness adjustments) with Fiji software to display but were not modified for quantification with Cell profiler. Fluorescence was detected with secondary antibody 350,488, 555,647 nm (5–7).

## **Automated image analysis for quantification**

Quantitative analyses on images were performed using the Cell profiler software (*Carpenter AE et al., 2006*). DAPI stained nucleus were segmented into primary objects using Cell profiler segmentation pipeline. Then, the threshold to define positive nuclei for a given target was based on control staining on embryoid body section not expressing the target of interest. All images across conditions were then automatically analyzed in batch ensuring unbiased analysis. The analyses of the FOXP1 and SCIP immunostaining intensity were performed using Cell profiler (Broad Institute open source at [www.cellprofiler.org](http://www.cellprofiler.org)) combined with the software FCS express 7 (DeNovo Software, Glendale, CA, USA). DAPI stained nucleus were segmented into primary objects using Cell profiler segmentation pipeline and intensities of fluorescence for FOXP1 and

SCIP were calculated in each primary object. FCS express 7 software was used to represent the fluorescence intensity for FOXP1 and SCIP into fluorescence intensity plots allowing a visualization of signal intensities for all individual cells and determination of cells expression different levels of the transcription factors.

### **Quantitative RT-PCR analysis**

Total RNA were extracted (RNAeasy, Qiagen) and cDNA synthesized using SuperScript III (Invitrogen). Quantitative real-time RT-PCR was performed using a 7900HT fast real time PCR system (Applied Biosystems) with Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Primers are listed in Supplementary Table 2. All expression data were normalized to *Cyclophilin A* mRNA. All analyses were performed with three technical replicates per plate. Relative expression levels were determined by calculating  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

### **Statistical analysis.**

Statistics were computed using Kruskal wallis or one-way analysis of variance (ANOVA) as indicated (Table S1). All statistics were computed in Prism using *P* values as indicated. Independent differentiations are differentiations performed on different weeks and started with newly thawed hPSCs.

### **RNA sequencing**

hES were exposed to Chir 3uM together with LDN and SB while forming embryoid bodies. Progenitors were collected on day 2, day 3 and day 4 of differentiation and processed for total RNA preparation. For each of the 8 samples, total RNA were reverse transcribed using the Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression kit (Thermofisher Scientific). The cDNA libraries were amplified and barcoded using Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression core panel and Ion Xpress Barcode Adapter (Thermofisher Scientific). The amplicons were quantified using Agilent High Sensitivity DNA kit before the samples were pooled in sets of eight. Emulsion PCR and Enrichment was performed on the Ion OT2 system Instrument using the Ion PI Hi-Q OT2 200 kit (Thermofisher Scientific). Samples were loaded on an Ion PI v3 Chip and sequenced on the Ion Proton System using Ion PI Hi-Q sequencing 200 kit chemistry (200 bp read length; Thermofisher Scientific). The Ion Proton reads (FASTQ files) were imported into the RNA-seq pipeline of Partek Flow software (v6 Partek Inc) using hg19 as a reference genome. The number of reads per sample was ranging from 7,5 million to 12 million reads. To determine genes that are differentially expressed between groups mapped

reads were quantified using Partek E/M algorithm normalized by the Total count/sample (the resulting counts represent the gene expression levels on reads/millions for over 20,800 different genes present in the AmpliSeq Human Gene Expression panel). The evaluation of the differential expression between two conditions was performed using the DESeq2 package under R. Pathway enrichment among differentially expressed genes (fold change  $\geq 2$ ,  $p \leq 0.05$ ) was determined using the ReactomePA package and the Reactome Pathway database through a geometric test.

**Table 1. Antibodies**

<b>Target</b>	<b>HOST species</b>	<b>Dilution</b>	<b>Supplier</b>	<b>References</b>
<b>CDX2</b>	Rabbit	1:1000	Abcam	AB76541
<b>FOXP1</b>	Rabbit	1:32000	Abcam	AB16645
<b>FOXP1</b>	Mouse	1:3000	R&D systems	MAB45341
<b>HB9</b>	Mouse	1:50	DSHB	81.5C10
<b>HOXA5</b>	Rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich	ARP31447_P050
<b>HOXA5</b>	Guinea-pig	1 :1000	H. Wichterle	Cu570
<b>HOXC5</b>	Rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich	HPA026794
<b>HOXC6</b>	Rabbit	1:8000	Euromedex	ARP38484_P50
<b>HOXC8</b>	Mouse	1:10000	Ozyme	BLE920502
<b>HOXC9</b>	Guinea Pig	1:300	J Dasen Lab	-
<b>HOXD9</b>	Rabbit	1:1500	Santa-cruz	SC-8320
<b>HOXC10</b>	Rabbit	1:800	Sigma-Aldrich	HPA053919
<b>HuC/D</b>	Rabbit	1/500	ThermoFischer	A21271
<b>ISL1</b>	Goat	1:1000	Neuromics	GT15051
<b>NEUROFILAMENT</b>	Chixcken	1:500	Neuromics	CH22105
<b>SCIP</b>	Rabbit	1:1000	Abcam	AB126746
<b>SOX2</b>	Mouse	1:200	Abcam	AB79351
<b>TBXT/BRACHURY</b>	Goat	1:800	R&D systems	AF2085

**Table 2. Real time PCR Primers**

Primer Sequences	Primer Name	Targeted Gene	Forward or reverse primer
GGAGATCATAGTTCCGTGAGC	<i>HOXA5-fw</i>	<i>HOXA5</i>	forward
GCTGAGATCCATGCCATTGT	<i>HOXA5-rv</i>	<i>HOXA5</i>	Reverse
CCGCCACAGATTTACCCGT	<i>HOXC5-fw</i>	<i>HOXC5</i>	forward
AGTCTGGTAGCGCGTGTAAC	<i>HOXC5-rv</i>	<i>HOXC5</i>	Reverse
CCAGGACCAGAAAGCCAGTA	<i>HOXC6-fw</i>	<i>HOXC6</i>	forward
GTTAGGTAGCGATTGAAGTGAAA	<i>HOXC6-rv</i>	<i>HOXC6</i>	Reverse
CCTCCGCCAACACTAACAGT	<i>HOXC8-fw</i>	<i>HOXC8</i>	forward
CAAGGTCTGATACCGGCTGT	<i>HOXC8-rv</i>	<i>HOXC8</i>	Reverse
ACCTCCTAGCGTCCAGGTTT	<i>HOXC9-fw</i>	<i>HOXC9</i>	forward
CGAAGCTACAGGACGGAAA	<i>HOXC9-rv</i>	<i>HOXC9</i>	Reverse
TCGCTGAAGGAGGAGGAGA	<i>HOXD9-fw</i>	<i>HOXD9</i>	forward
CAAACACCCACAAAGGAAAAC	<i>HOXD9-rv</i>	<i>HOXD9</i>	Reverse
ACCTCGGATAACGAAGCGAAA	<i>HOXC10-fw</i>	<i>HOXC10</i>	forward
TCCAGCGTCTGGTGTTTAGT	<i>HOXC10-rv</i>	<i>HOXC10</i>	Reverse
GAACCTGTGCGAGTGGATG	<i>CDX2-fw</i>	<i>CDX2</i>	forward
GGATGGTGATGTAGCGACTG	<i>CDX2-rv</i>	<i>CDX2</i>	Reverse
TCTTTGCTTGGGAAATCCG	<i>PAX6-fw</i>	<i>PAX6</i>	forward
CTGCCCGTTCAACATCCTTAG	<i>PAX6-rv</i>	<i>PAX6</i>	Reverse
GATGCACAACCTCGGAGATCA	<i>SOX1-fw</i>	<i>SOX1</i>	forward
GTCCTTCTTGAGCAGCGTCT	<i>SOX1-rv</i>	<i>SOX1</i>	Reverse

**Table 3. Differentiation factors**

Molecule	Concentration	Supplier	Reference
RA	100-1000nM	Sigma	R2625
LDN-193189	100nM	Ozyme	STE04-0074
SB431542	20nM	Ozyme	STE04-0010-10
CHIR-99021 (CT99021)	3µM	Euromedex	S1263-25MG
SAG	400nM	Merck	566660
FGF 2	5-120ng/ml	Peptotech	100-18B
FGF 8	120ng/ml	Peptotech	100-25
GDF11	25ng/ml	Peptotech	120-11
DAPT	10µM	Ozyme	STE04-0041

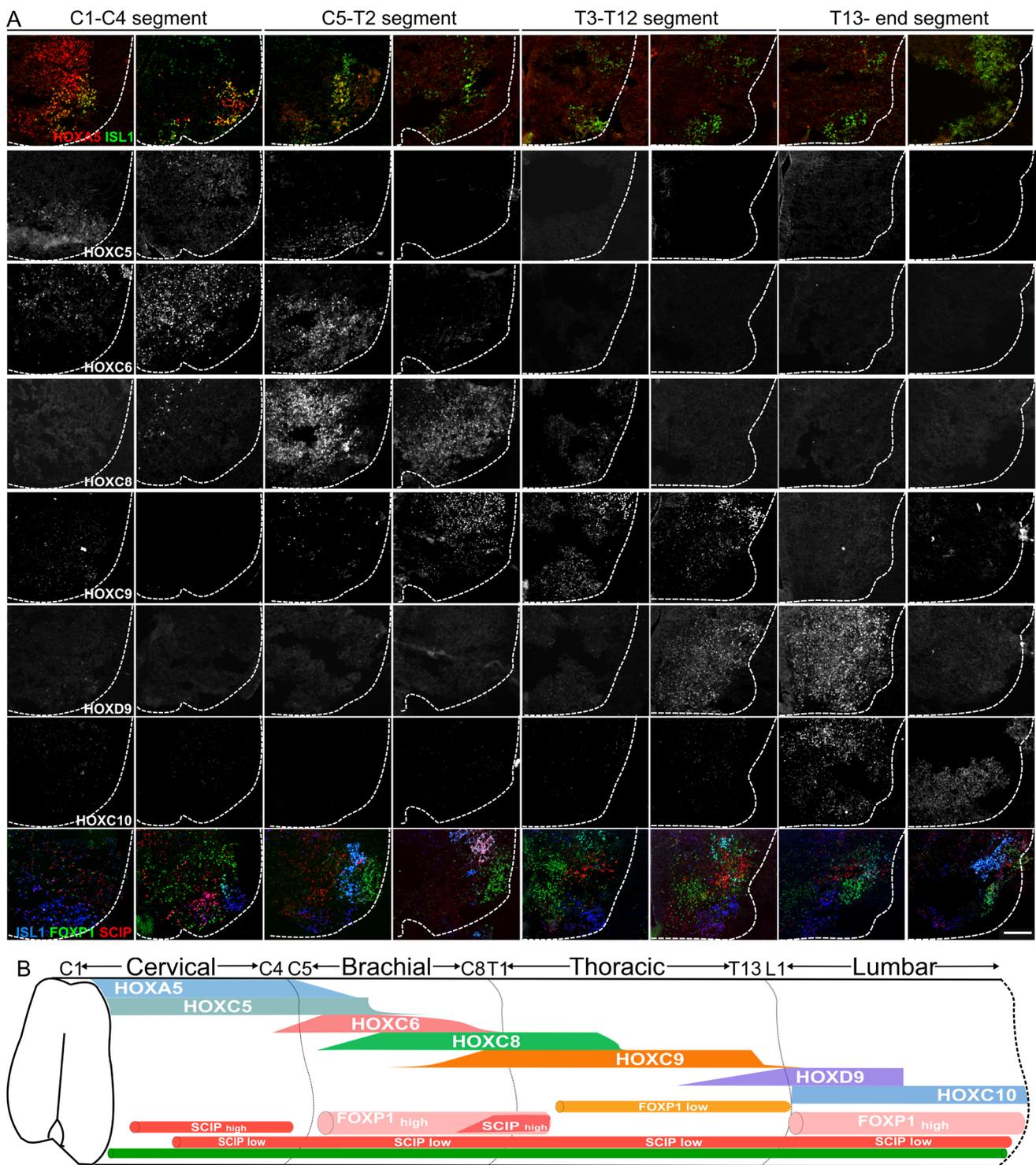
## Bibliography

- Aires, R., de Lemos, L., Nóvoa, A., Jurberg, A.D., Mascrez, B., Duboule, D., and Mallo, M. (2019). Tail Bud Progenitor Activity Relies on a Network Comprising Gdf11, Lin28, and Hox13 Genes. *Dev. Cell*.
- Amoroso, M.W., Croft, G.F., Williams, D.J., O’Keeffe, S., Carrasco, M.A., Davis, A.R., Roybon, L., Oakley, D.H., Maniatis, T., Henderson, C.E., et al. (2013). Accelerated High-Yield Generation of Limb-Innervating Motor Neurons from Human Stem Cells. *J. Neurosci.* *33*, 574–586.
- Baek, M., Pivetta, C., Liu, J.P., Arber, S., and Dasen, J.S. (2017). Columnar-Intrinsic Cues Shape Premotor Input Specificity in Locomotor Circuits. *Cell Rep*.
- Bel-Vialar, S., Itasaki, N., and Krumlauf, R. (2002). Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development* *129*, 5103–5115.
- Cambray, N., and Wilson, V. (2002). Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge. *Development*.
- Cambray, N., and Wilson, V. (2007). Two distinct sources for a population of maturing axial progenitors. *Development*.
- Del Corral, R.D., and Storey, K.G. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: A signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *BioEssays* *26*, 857–869.
- Dasen, J.S., and Jessell, T.M. (2009). Chapter Six Hox Networks and the Origins of Motor Neuron Diversity. *Curr. Top. Dev. Biol.* *88*, 169–200.
- Dasen, J.S., Liu, J.P., and Jessell, T.M. (2003). Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* *425*, 926–933.
- Denham, M., Hasegawa, K., Menhenniott, T., Rollo, B., Zhang, D., Hough, S., Alshawaf, A., Febbraro, F., Ighaniyan, S., Leung, J., et al. (2015). Multipotent caudal neural progenitors derived from human pluripotent stem cells that give rise to lineages of the central and peripheral nervous system. *Stem Cells* *33*, 1759–1770.
- Deschamps, J., and Duboule, D. (2017). Embryonic timing, axial stem cells, chromatin dynamics, and the Hox clock. *Genes Dev.* *31*, 1406–1416.
- Dias, J.M., Alekseenko, Z., Applequist, J.M., and Ericson, J. (2014). Tgf $\beta$  signaling regulates temporal neurogenesis and potency of neural stem cells in the CNS. *Neuron* *84*, 927–939.
- Duval, N., Vaslin, C., Barata, T.C., Frarma, Y., Contremoulins, V., Baudin, X., Nedelec, S., and Ribes, V.C. (2019). BMP4 patterns Smad activity and generates stereotyped cell fate organization in spinal organoids. *Development*.
- Ebisuya, M., and Briscoe, J. (2018). What does time mean in development? *Dev.*
- Edri, S., Hayward, P., Jawaid, W., and Martinez Arias, A. (2019). Neuro-mesodermal progenitors (NMPs): a comparative study between pluripotent stem cells and embryo-derived populations. *Development*.

- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* 3, 519–532.
- Evtouchenko, L., Studer, L., Spencer, C., Dreher, E., and Seiler, R.W. (1996). A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. *Cell Transplant.*
- Forlani, S., Lawson, K.A., and Deschamps, J. (2003). Acquisition of Hox codes during gastrulation and axial elongation in the mouse embryo. *Development.*
- Frith, T.J.R., Granata, I., Wind, M., Stout, E., Thompson, O., Neumann, K., Stavish, D., Heath, P.R., Ortmann, D., Hackland, J.O.S., et al. (2018). Human axial progenitors generate trunk neural crest cells in vitro. *Elife.*
- Gaspard, N., Bouchet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., Van Den Aemele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., et al. (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455, 351–357.
- Gaunt, S.J., George, M., and Paul, Y.L. (2013). Direct activation of a mouse Hoxd11 axial expression enhancer by Gdf11/Smad signalling. *Dev. Biol.* 383, 52–60.
- Gouti, M., Tsakiridis, A., Wymeersch, F.J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V., and Briscoe, J. (2014). In vitro generation of neuromesodermal progenitors reveals distinct roles for wnt signalling in the specification of spinal cord and paraxial mesoderm identity. *PLoS Biol.* 12.
- Gouti, M., Delile, J., Stamataki, D., Wymeersch, F.J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V., and Briscoe, J. (2017). A Gene Regulatory Network Balances Neural and Mesoderm Specification during Vertebrate Trunk Development. *Dev. Cell* 41, 243-261.e7.
- Henrique, D., Abranches, E., Verrier, L., and Storey, K.G. (2015). Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord. *Development* 142, 2864–2875.
- Juan, A.H., and Ruddle, F.H. (2003). Enhancer timing of Hox gene expression: Deletion of the endogenous Hoxc8 early enhancer. *Development.*
- Kim, J., Wu, H.H., Lander, A.D., Lyons, K.M., Matzuk, M.M., and Calof, A.L. (2005). Developmental biology: GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. *Science* (80- ).
- Koch, F., Scholze, M., Wittler, L., Schifferl, D., Sudheer, S., Grote, P., Timmermann, B., Macura, K., and Herrmann, B.G. (2017). Antagonistic Activities of Sox2 and Brachyury Control the Fate Choice of Neuro-Mesodermal Progenitors. *Dev. Cell* 42, 514-526.e7.
- Kohwi, M., and Doe, C.Q. (2013). Temporal fate specification and neural progenitor competence during development. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 823–838.
- Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Donnadiou, A.C., Frydman, R., Habert, R., and Rouiller-Fabre, V. (2006). Use of organ culture to study the human fetal testis development: Effect of retinoic acid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
- Lippmann, E.S., Williams, C., Ruhl, D.A., Estevez-Silva, M.C., Chapman, E.R., Coon, J.J., and Ashton, R.S. (2015). Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm. *Stem Cell Reports* 4, 632–644.

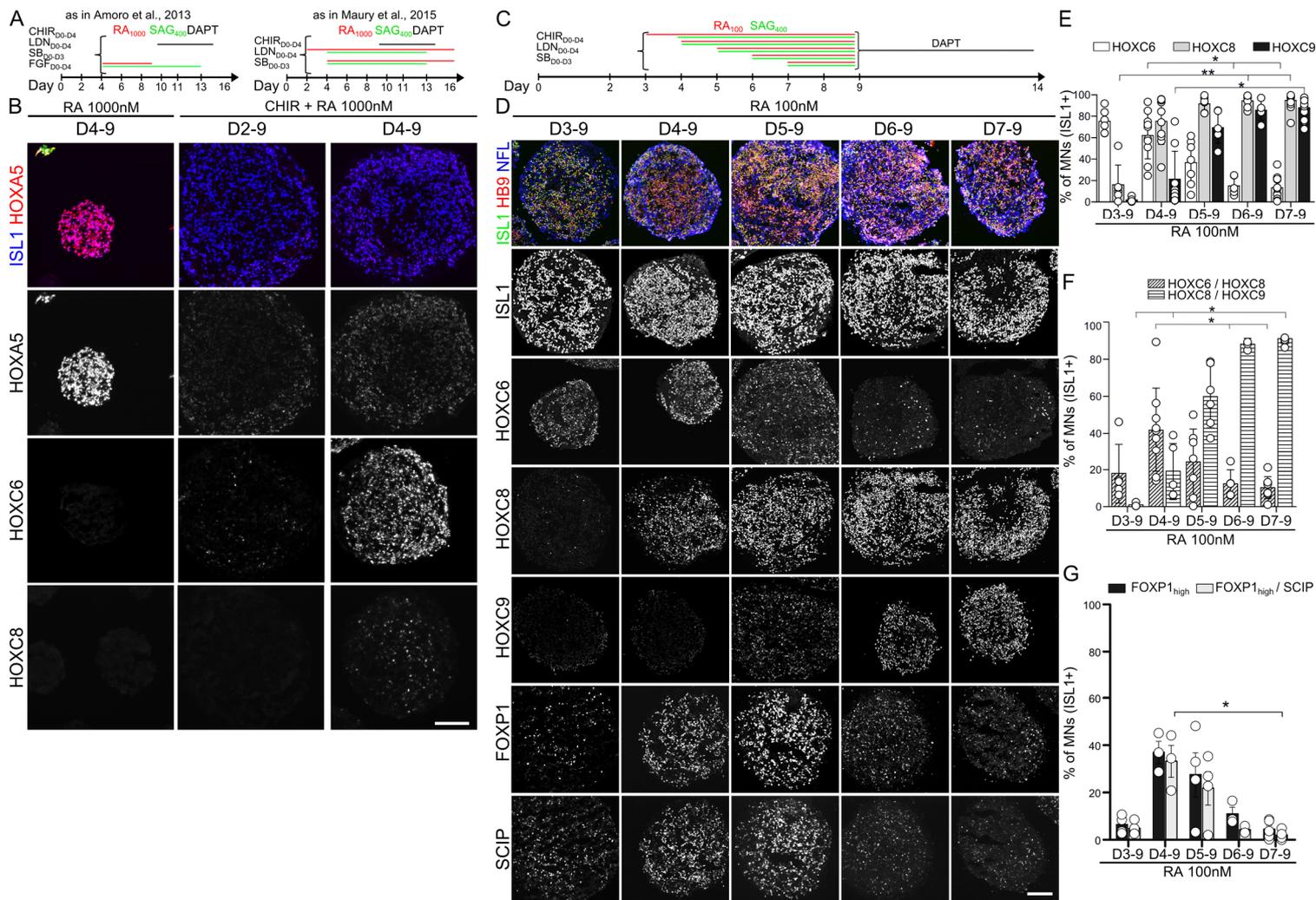
- Liu, J.-P. (2006). The function of growth/differentiation factor 11 (Gdf11) in rostrocaudal patterning of the developing spinal cord. *Development* *133*, 2865–2874.
- Liu, J.-P., Laufer, E., and Jessell, T.M. (2001). Assigning the Positional Identity of Spinal Motor Neurons. *Neuron* *32*, 997–1012.
- Lunn, J.S., Fishwick, K.J., Halley, P.A., and Storey, K.G. (2007). A spatial and temporal map of FGF/Erk1/2 activity and response repertoires in the early chick embryo. *Dev. Biol.* *302*, 536–552.
- Mathis, L., and Nicolas, J.F. (2000). Different clonal dispersion in the rostral and caudal mouse central nervous system. *Development* *127*, 1277–1290.
- Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* *33*.
- Mazzoni, E.O., Mahony, S., Peljto, M., Patel, T., Thornton, S.R., McCuine, S., Reeder, C., Boyer, L.A., Young, R.A., Gifford, D.K., et al. (2013). Saltatory remodeling of Hox chromatin in response to rostrocaudal patterning signals. *Nat. Neurosci.* *16*, 1191–1198.
- McGrew, M.J., Sherman, A., Lillico, S.G., Ellard, F.M., Radcliffe, P.A., Gilhooley, H.J., Mitrophanous, K.A., Cambray, N., Wilson, V., and Sang, H. (2008). Localised axial progenitor cell populations in the avian tail bud are not committed to a posterior Hox identity. *Development* *135*, 2289–2299.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1999). Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat. Genet.*
- Mendelsohn, A.I., Dasen, J.S., and Jessell, T.M. (2017). Divergent Hox Coding and Evasion of Retinoid Signaling Specifies Motor Neurons Innervating Digit Muscles. *Neuron* *93*, 792–805.e4.
- Novitsch, B.G., Wichterle, H., Jessell, T.M., and Sockanathan, S. (2003). A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* *40*, 81–95.
- Oberst, P., Agirman, G., and Jabaudon, D. (2019a). Principles of progenitor temporal patterning in the developing invertebrate and vertebrate nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*
- Oberst, P., Fièvre, S., Baumann, N., Concetti, C., Bartolini, G., and Jabaudon, D. (2019b). Temporal plasticity of apical progenitors in the developing mouse neocortex. *Nature.*
- Patani, R., Hollins, A.J., Wishart, T.M., Puddifoot, C.A., Álvarez, S., De Lera, A.R., Wyllie, D.J.A., Compston, D.A.S., Pedersen, R.A., Gillingwater, T.H., et al. (2011). Retinoid-independent motor neurogenesis from human embryonic stem cells reveals a medial columnar ground state. *Nat. Commun.*
- Peljto, M., Dasen, J.S., Mazzoni, E.O., Jessell, T.M., and Wichterle, H. (2010). Functional diversity of ESC-derived motor neuron subtypes revealed through intraspinal transplantation. *Cell Stem Cell* *7*, 355–366.

- Philippidou, P., and Dasen, J.S. (2013). Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization. *Neuron* 80, 12–34.
- Rossi, A.M., Fernandes, V.M., and Desplan, C. (2017). Timing temporal transitions during brain development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 42, 84–92.
- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J.T., Fasano, C.A., Phoenix, T.N., Lemischka, I.R., Ivanova, N.B., Stifani, S., Morrissey, E.E., and Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat. Neurosci.* 9, 743–751.
- Sweeney, L.B., Bikoff, J.B., Gabitto, M.I., Brenner-Morton, S., Baek, M., Yang, J.H., Tabak, E.G., Dasen, J.S., Kintner, C.R., and Jessell, T.M. (2018). Origin and Segmental Diversity of Spinal Inhibitory Interneurons. *Neuron*.
- Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., and van den Aemele, J. (2012a). Cortical neurogenesis and morphogens: Diversity of cues, sources and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.*
- Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., and van den Aemele, J. (2012b). Cortical neurogenesis and morphogens: Diversity of cues, sources and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 269–276.
- Tsakiridis, A., Huang, Y., Blin, G., Skylaki, S., Wymeersch, F., Osorno, R., Economou, C., Karagianni, E., Zhao, S., Lowell, S., et al. (2014). Distinct Wnt-driven primitive streak-like populations reflect in vivo lineage precursors. *Development* 141, 1209–1221.
- Tschopp, P., Tarchini, B., Spitz, F., Zakany, J., and Duboule, D. (2009). Uncoupling time and space in the collinear regulation of Hox genes. *PLoS Genet.*
- Turner, D.A., Hayward, P.C., Baillie-Johnson, P., Rue, P., Broome, R., Faunes, F., and Martinez Arias, A. (2014). Wnt/ -catenin and FGF signalling direct the specification and maintenance of a neuromesodermal axial progenitor in ensembles of mouse embryonic stem cells. *Development* 141, 4243–4253.
- Tzouanacou, E., Wegener, A., Wymeersch, F.J., Wilson, V., and Nicolas, J.F. (2009). Redefining the Progression of Lineage Segregations during Mammalian Embryogenesis by Clonal Analysis. *Dev. Cell* 17, 365–376.
- Wilson, V., Olivera-Martinez, I., and Storey, K.G. (2009a). Stem cells, signals and vertebrate body axis extension. *Development*.
- Wilson, V., Olivera-Martinez, I., and Storey, K.G. (2009b). Stem cells, signals and vertebrate body axis extension. *Development* 136, 2133–2133.
- Wymeersch, F.J., Huang, Y., Blin, G., Cambray, N., Wilkie, R., Wong, F.C.K., and Wilson, V. (2016a). Position-dependent plasticity of distinct progenitor types in the primitive streak. *Elife* 5.
- Wymeersch, F.J., Huang, Y., Blin, G., Cambray, N., Wilkie, R., Wong, F.C.K., and Wilson, V. (2016b). Position-dependent plasticity of distinct progenitor types in the primitive streak. *Elife* 5, 1–28.
- Wymeersch, F.J., Skylaki, S., Huang, Y., Watson, J.A., Economou, C., Marek-Johnston, C., Tomlinson, S.R., and Wilson, V. (2019). Transcriptionally dynamic progenitor populations organised around a stable niche drive axial patterning. *Dev.*



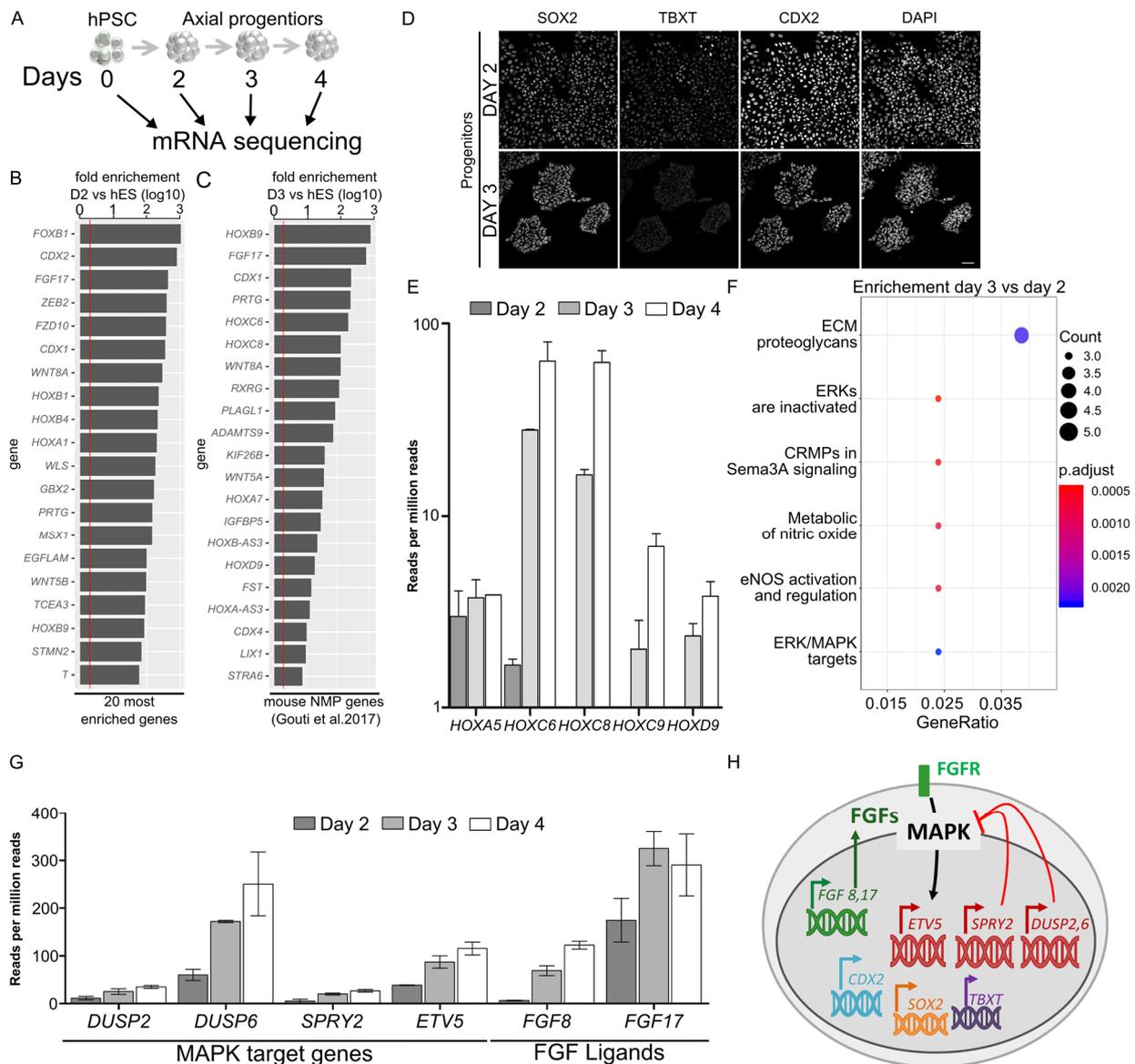
**Figure 1) Characterization of the rostro-caudal distribution of motor neuron subtypes in the human embryonic spinal cord**

(A) Immunostaining of cryostat sections of a human embryonic spinal cord at 6.2 GW (Cervical 4/5; Thoracic 2/3, Thoracic 12/13). Scale bar: 100 $\mu$ m. (B) Summary of the rostro-caudal distributions of HOX, FOXP1 and SCIP transcription factors in motor neurons. Changes in shapes indicate an increase or decrease in the number of motor neurons expressing a given marker. FOXP1<sup>high</sup> motor neurons are located at brachial and lumbar levels exclusively in the lateral motor column where limb innervating motor neurons are located. FOXP1<sup>low</sup> motor neurons are located in the thoracic region motor neurons where preganglionic motor neurons are located in mouse. A ventral column of motor neurons expressing SCIP at low level is present all along the spinal cord while SCIP<sup>high</sup> motor neurons are found in FOXP1<sup>high</sup> in the caudal brachial and anterior thoracic spinal cord.



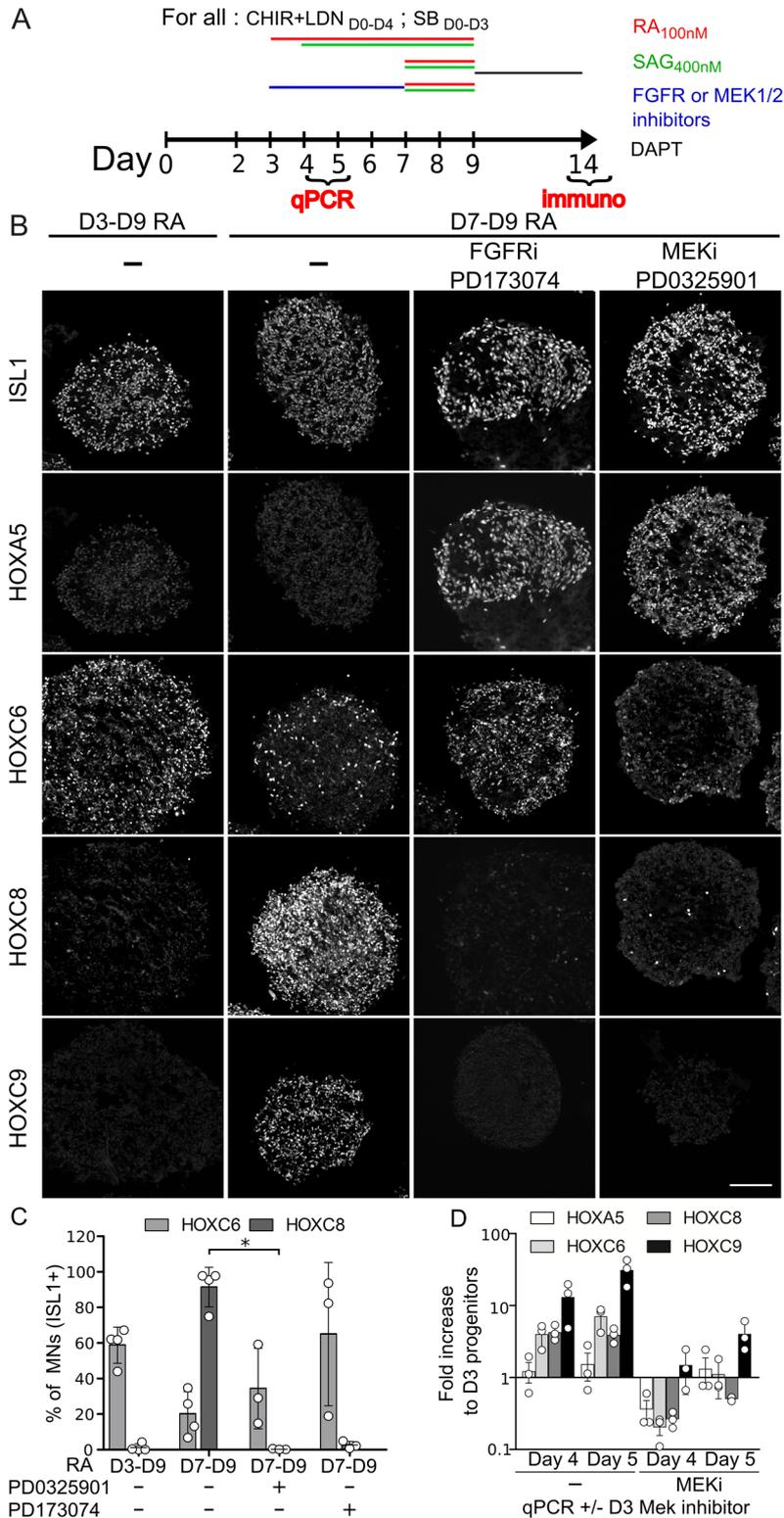
**Figure 2) Changes in the specification of motor neuron subtypes upon aging of Wnt induced hPSC-derived derived progenitors**

(A, C) Differentiation conditions. (B, D) Immunostaining for ISL1, HB9, (motor neurons), NFL (neurons), HOX transcription factors, FOXP1, SCIP on cryostat sections of embryoid bodies on day 14 of differentiation. (E, F, G) Quantification of indicated markers. Mean  $\pm$ SD. In graphs, a circle = one independent experiment. In each condition all cells were quantified in at least 5 independent embryoid bodies. Scale bars: 100  $\mu$ m.



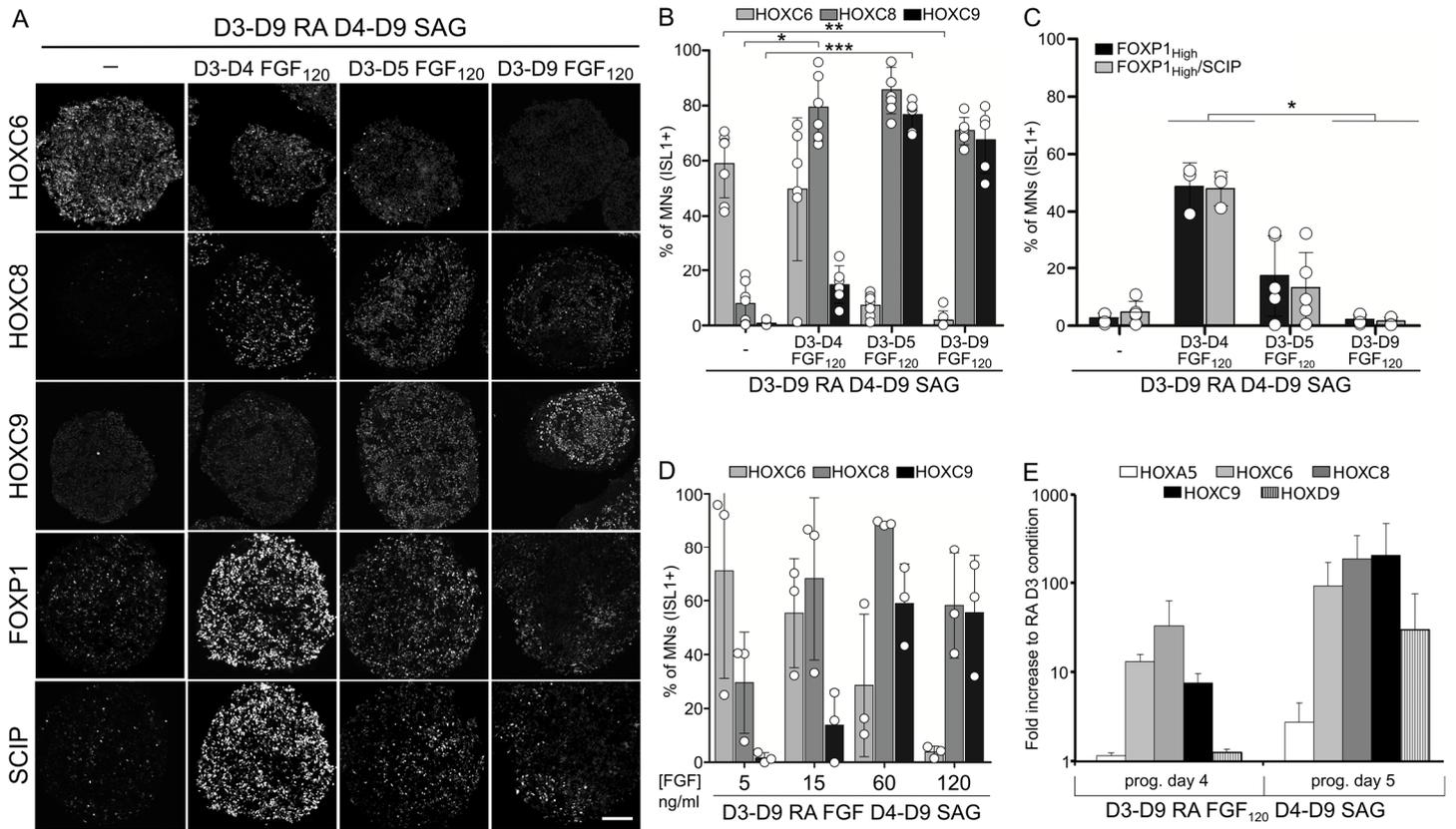
**Figure 3) Temporal transcriptomic analysis of hPSC-derived axial progenitors reveals a progressive increase in FGF pathway target genes paralleled by a collinear activation of HOX genes.**

(A) Experimental design; time points analyzed. (B) 20 most enriched genes in day 2 progenitors compared to hES. All genes are expressed in the mouse caudal lateral epiblast. (C) Mouse NMP genes as defined in Gouti et al, 2017 in day 3 progenitors compared to hES. Representation of the 20 most enriched among 12) expressed in day 2, 3 or 4 progenitors. (D) Immunostaining of day 2 and 3 progenitors for axial progenitor markers. (E) Transcriptional changes in HOX genes controlling MN subtype specification. (F) Reactome analysis of the genes upregulated more than 2 fold between day 3 and day 2. Gene ratio = number of gene associated with the annotation divided by the total number of genes enriched in day 3. Count = number of genes associated with the annotation. (G) Transcriptional changes of the FGF pathway related genes including the genes forming the clusters “ERKs are inactivated” and “ERK/MAPK targets” in (E). (H) Schematic representation of the NMP markers (SOX2, TBXT, CDX2) expressed in the hPSC-derived axial progenitors, the target genes of the MAPK (ETV5, and the negative regulator of the pathway SPRY2, DUSP2 and 6) and the two FGF ligands that increase over time in hPSC-derived aging axial progenitors.



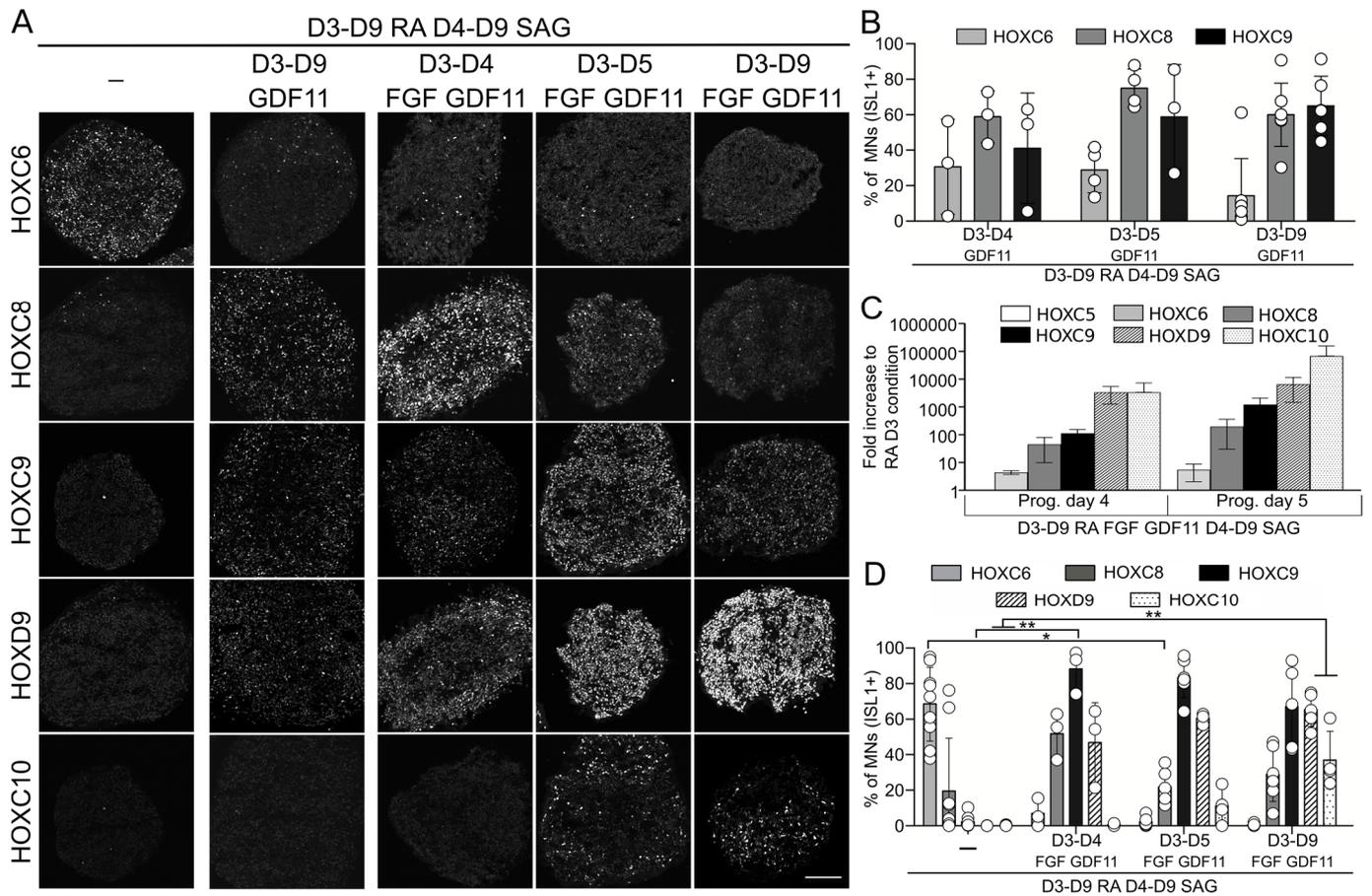
**Figure 4) FGF pathway inhibition stalls axial progenitors temporal fate patterning**

(A) Differentiation conditions to test the impact of blocking FGF Receptors (PD173074) or MEK1/2 kinase (PD032590). (B) Immunostaining for ISL1 (motor neurons) and HOX transcription factors on cryostat sections of embryoid bodies on day 14 of differentiation. (C) Quantification of indicated markers. (F) Real time PCR analysis of indicated HOX mRNAs in progenitors on D3, 4 and 5 of differentiation. All figures: mean  $\pm$ SD. In graphs, a circle corresponds to one experiment in which all cells were quantified on 3 independent EBs. Scale bar: 100 $\mu$ m



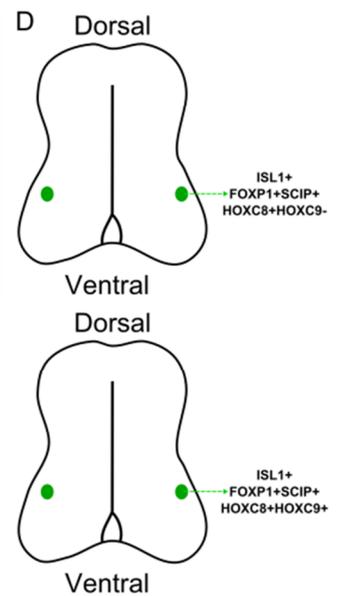
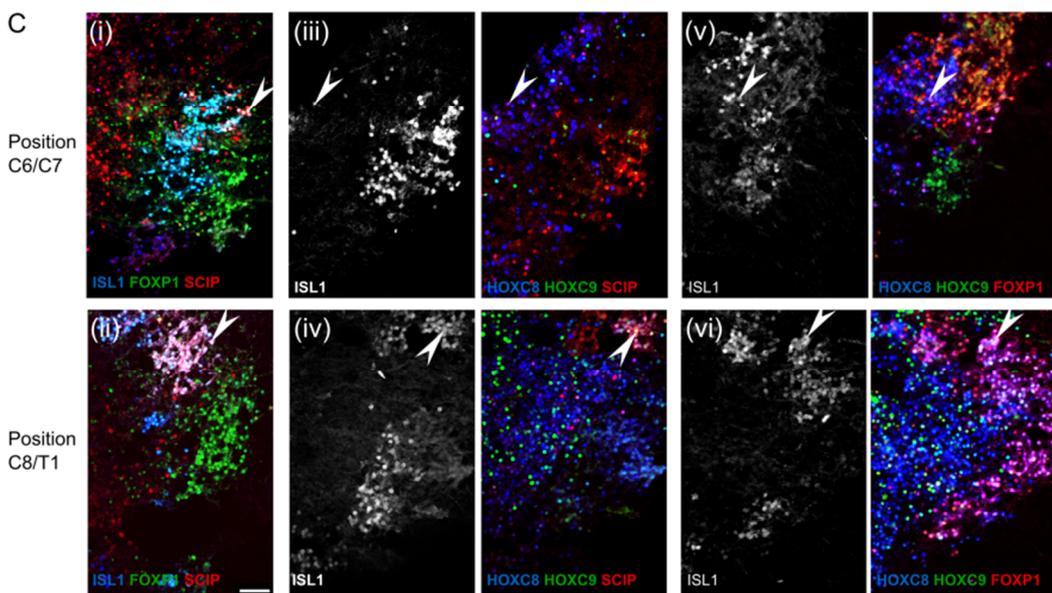
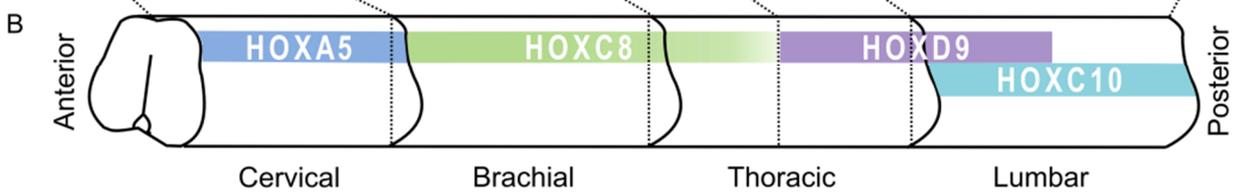
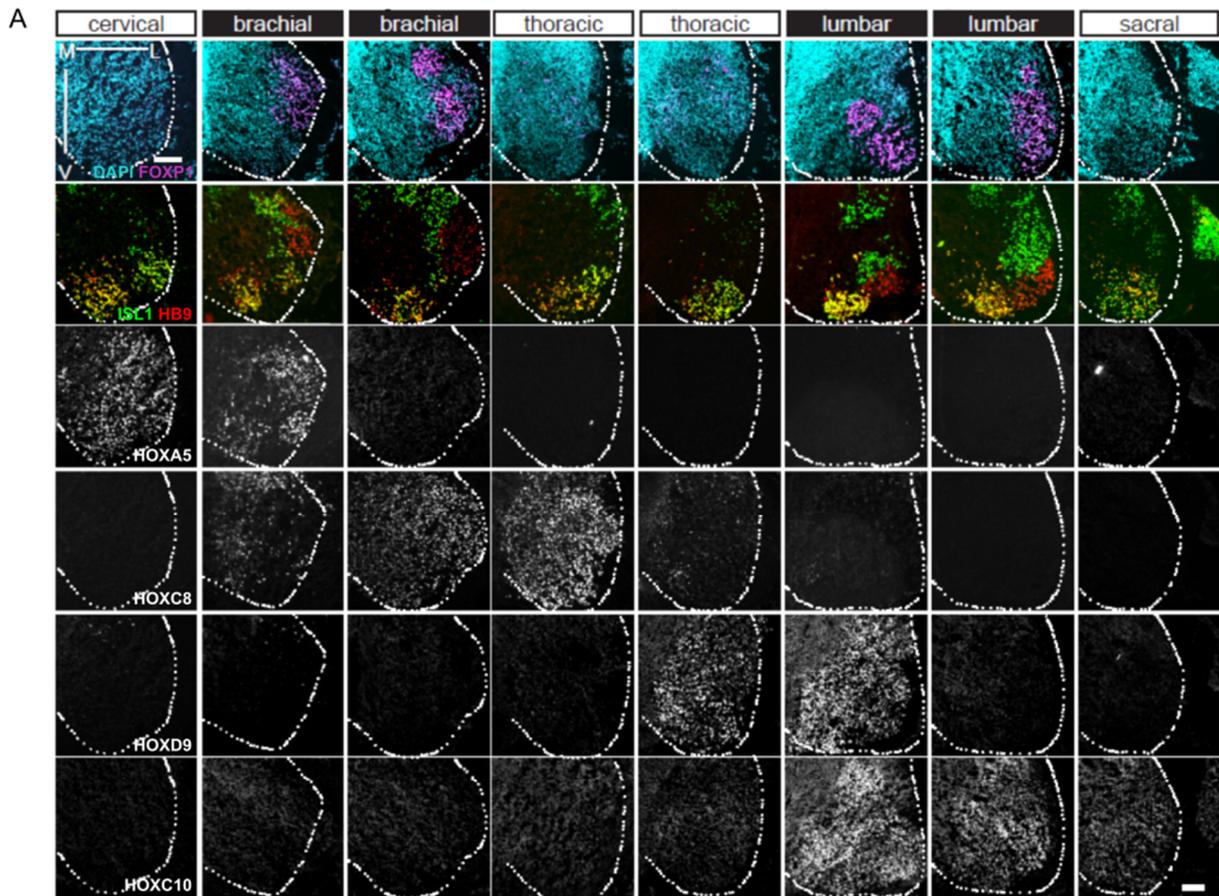
**Figure 5) FGF2 concentration and duration paces axial progenitor temporal patterning.**

A) Immunostaining for HOX, FOXP1 and SCIP transcription factors on cryostat sections of embryoid bodies on day 14 of differentiation. Scale bars: 100 $\mu$ m (B, C, D) Quantification of indicated markers. Mean  $\pm$ SD. For each graph, a circle corresponds to one experiment in which all cells were quantified on 5 independent EBs. (E) Real time PCR analysis of the expression of indicated *HOX* mRNA in day 4 and day 5 progenitors upon addition of FGF2.



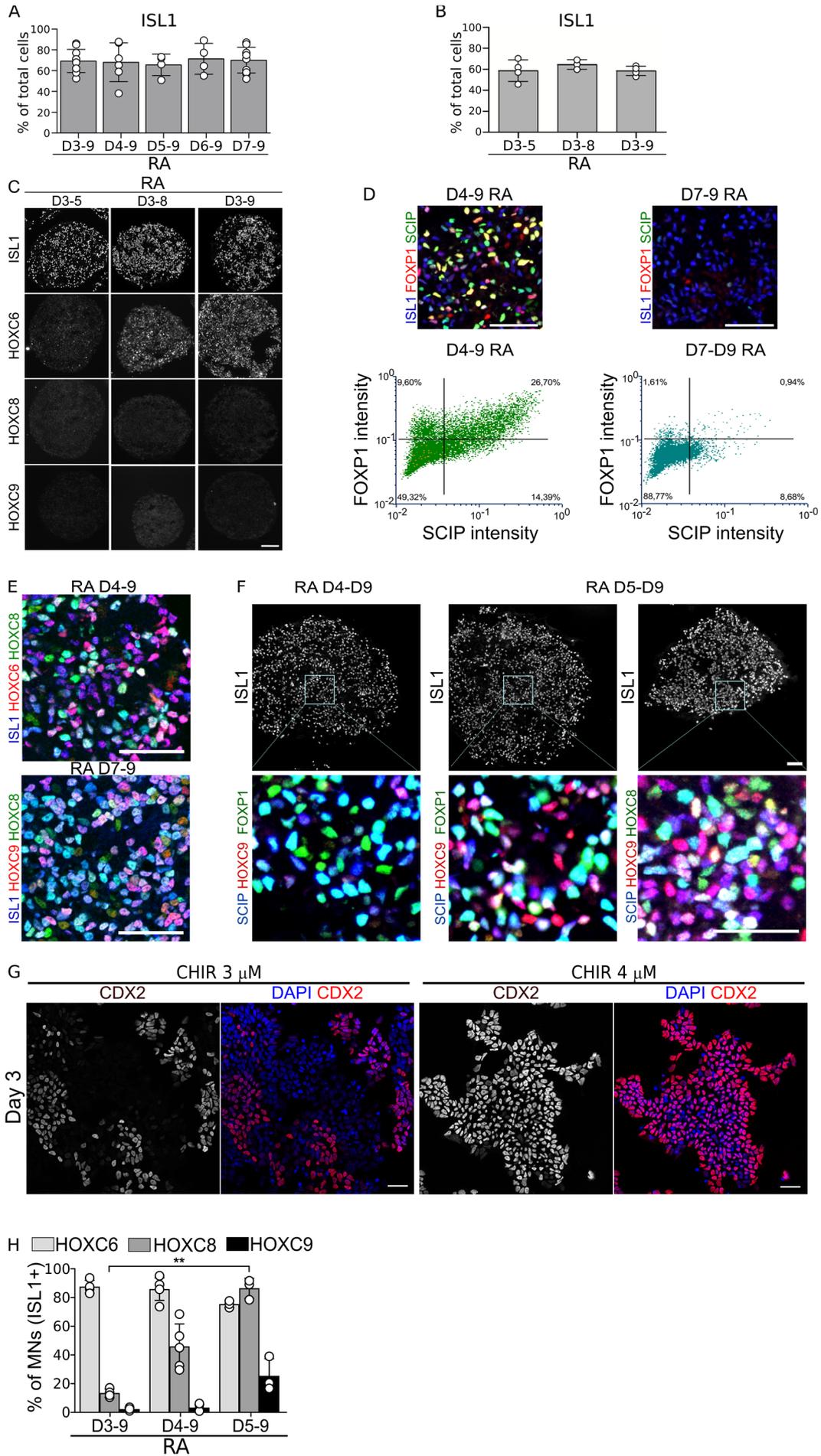
**Figure 6) FGF and GDF11 cooperate to pace axial progenitor temporal patterning.**

A) Immunostaining for HOX transcription factors on cryostat sections of embryoid bodies on day 14 of differentiation. In all conditions FGF 120 ng/ml, GDF11 25 ng/ml. (B, D) Quantification of indicated markers upon modulation of GDF11 and FGF GDF11. Mean  $\pm$ SD. For each graph, a circle corresponds to one experiment in which all cells were quantified on 5 independent EBs. (C) Real time PCR analysis of the expression of indicated *HOX* mRNA in day 4 and day 5 progenitors upon addition of FGF2 and GDF11. Scale bars: 100 $\mu$ m



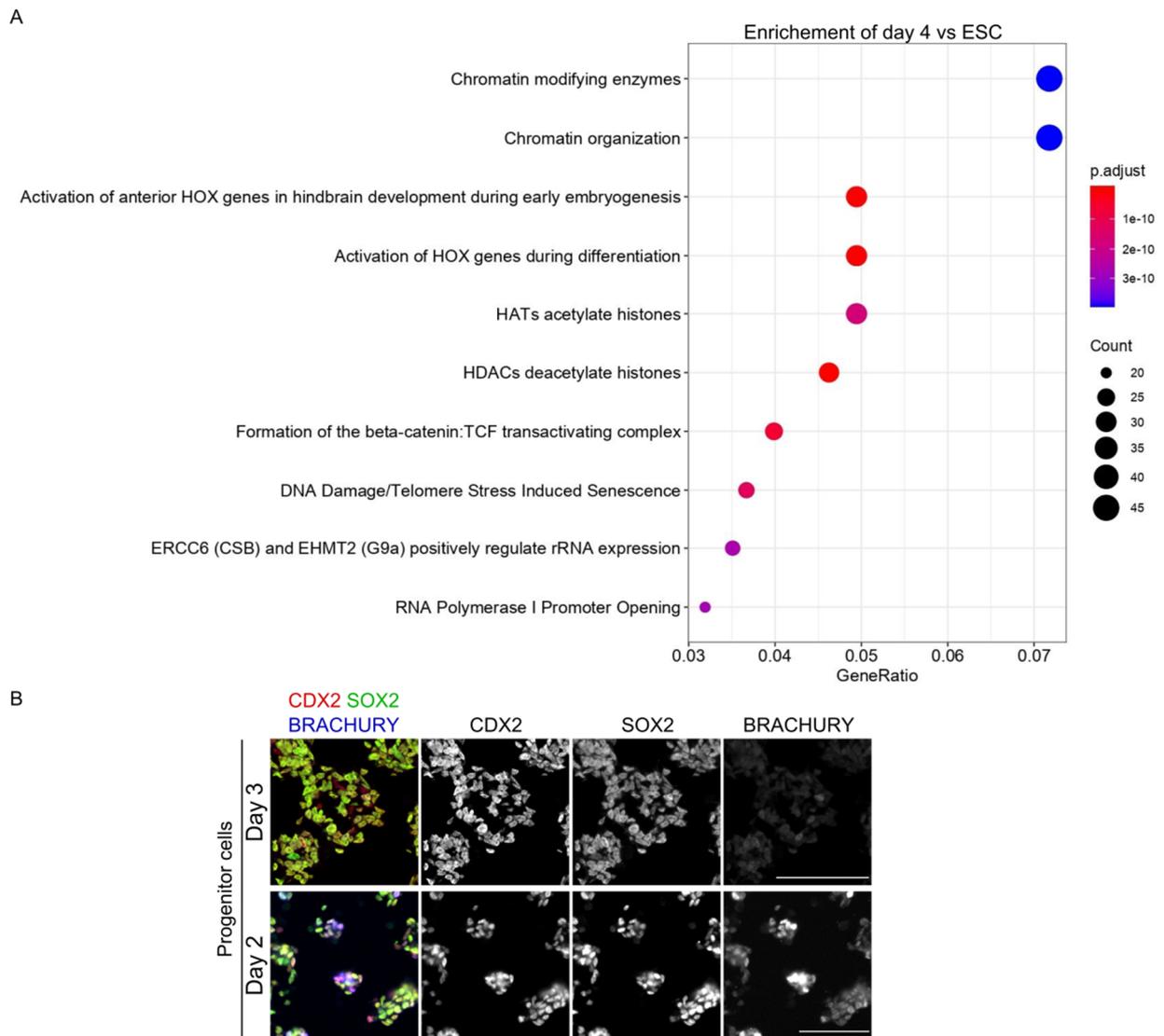
**Figure S1) Characterization of the rostro-caudal distribution of motor neuron subtypes in human embryonic spinal cords**

(A) Immunostaining on cryostat sections of a human embryonic spinal cord at 7.5 GW. Scale bar: 100 $\mu$ m. (B) Summary of the rostro-caudal distributions of HOX transcription factors within motor neurons. (C) Immunostaining on cryostat sections of a human embryonic spinal cord at 6.2 GW demonstrates the presence of two SCIP+ FOXP1+ MN populations. One HOXC9- at the C6/C7 brachial level and one HOXC9+ at the C8/T2 level. Scale bar: 50 $\mu$ m (D) Schematic representation of the two populations.



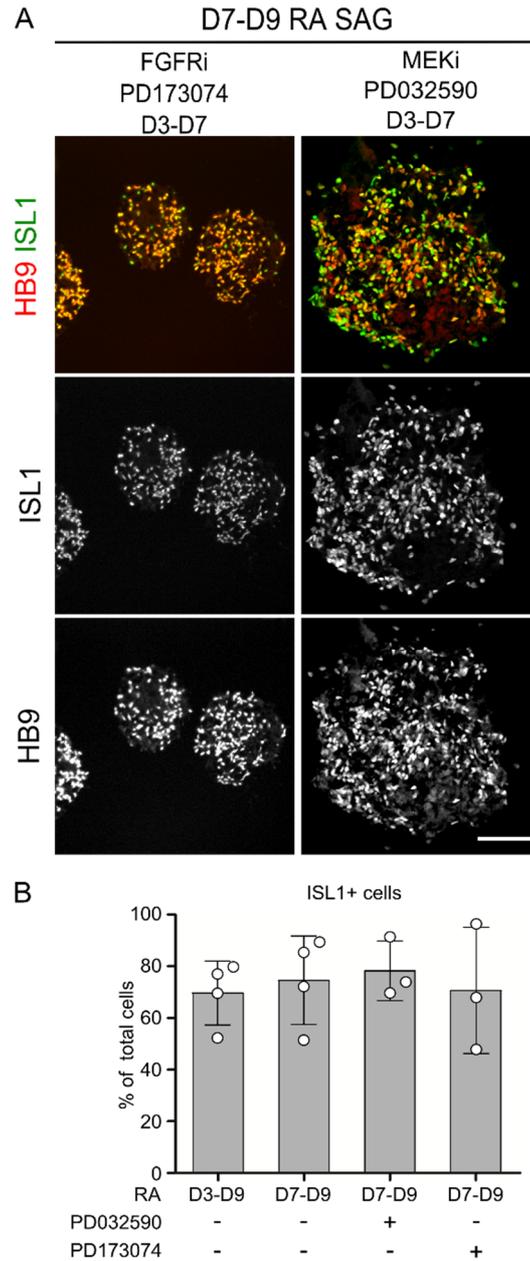
**Figure S2) The timing of exposure to RA but not the duration of RA controls the specification of caudal motor neurons in hES and iPS cells**

(A) Percentages of motor neurons generated upon systematic delay in RA addition (B and C) MN specification upon changes in RA duration starting from day 6 (2, 5, 6 days); quantification of the percentage of motor neurons (B) and impact on MN subtype identity analyzed by HOX immunostaining on cryostat sections of EBs. (D) Method for the quantification of FOXP1 and SCIP motor neurons. Images has shown were analyzed with cell profiler to determine the fluorescent intensity of each marker in all motor neurons (ISL1+ cells). The intensity plots were then generated with FCS. (E) Representative images of the costainings for the indicated markers quantified in Fig.2F. (F) Immunostaining on cryostat sections of EBs showing the presence of HOXC9/FOXP1/SCIP motor neurons that correspond to forepaw innervating motor neurons in mouse. (G) Immunostaining for CDX2 on D3 progenitors upon 3 or 4  $\mu$ M CHIR99021 (H) Percentage of HOXs in motor neurons generated from human iPS cells (WTS2 line) upon delay in RA addition.



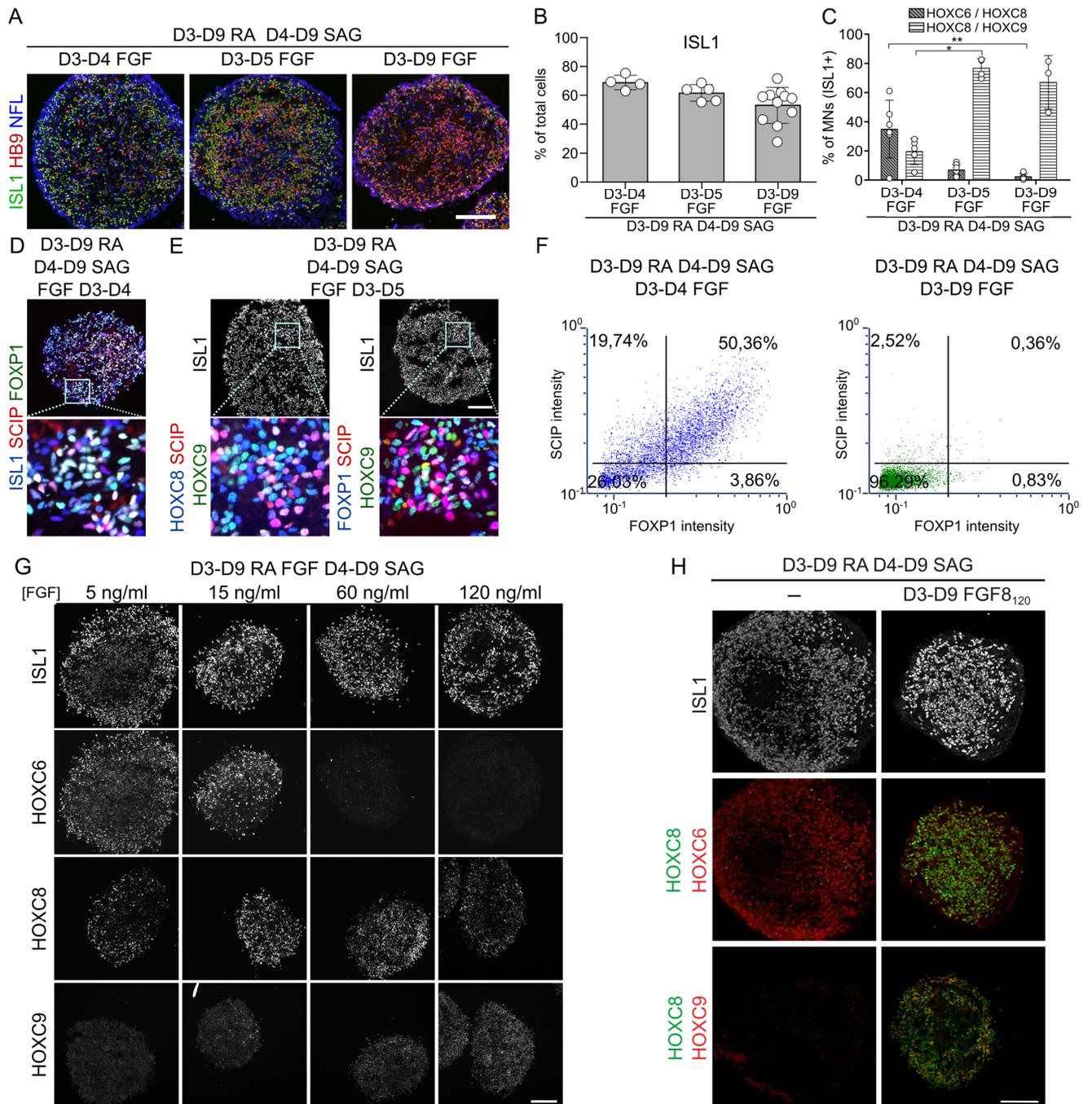
**Figure S3) Transcriptomic and immunostaining analysis axial progenitors**

(A) Reactome pathway analysis of genes enriched more than 2 fold versus hES cells. of genes expressed more than 0,5 reads/ millions in day 4. (B) Immunostaining on cryostat sections of EBs on day 2 or day 3 of differentiation. Scale bar: 100µm.



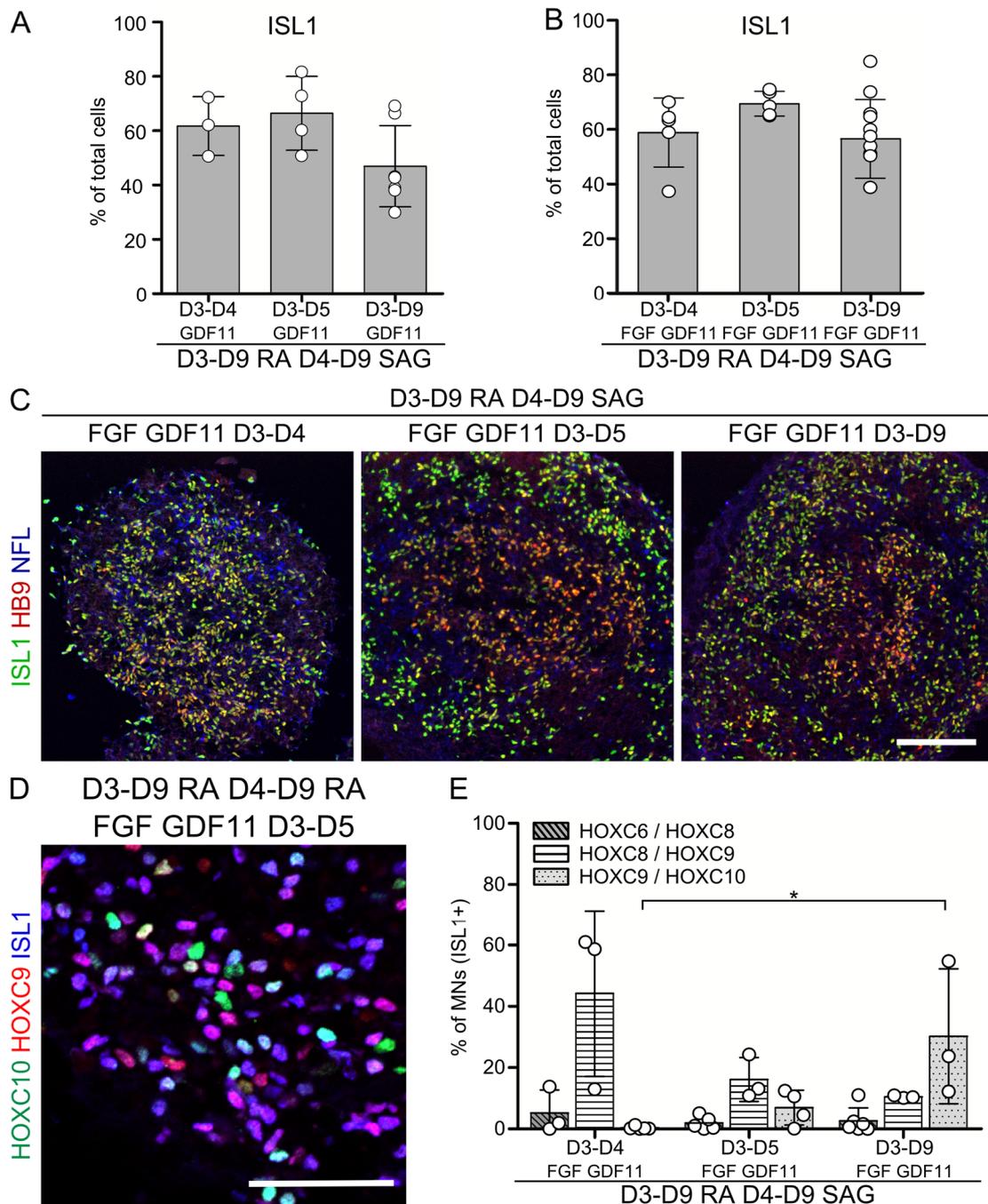
**Figure S4) MN specification and quantification in control and following addition of FGFR and MEK1/2 inhibitors.**

(A) Immunostaining on cryostat sections of EBs on day 14 of differentiation. Scale bar: 100 $\mu$ m.  
 (B) Quantification of the percentage of motor neurons in the different conditions.

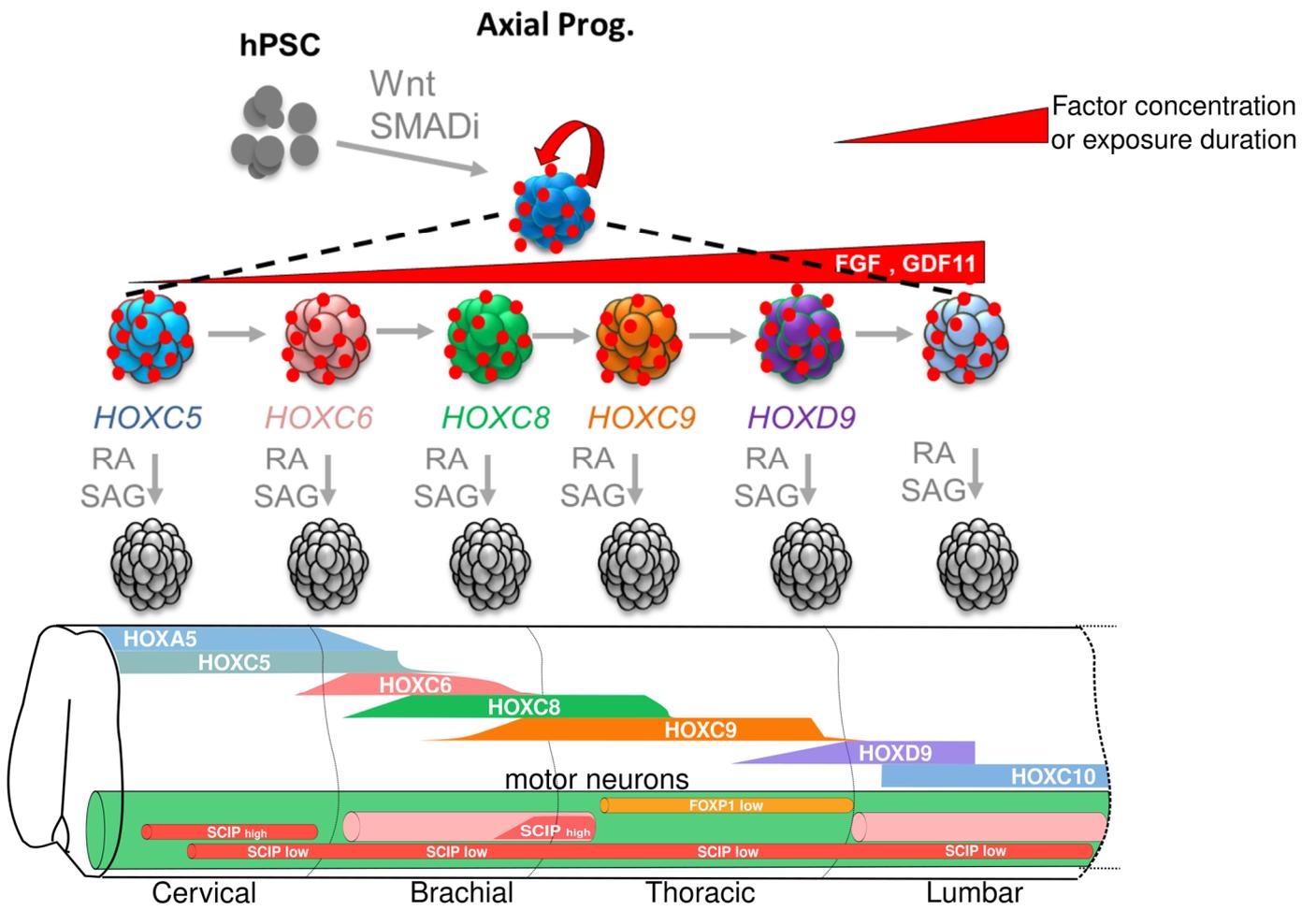


**Figure S5) Modulation of FGF controls MN subtype identity**

(A) Immunostaining on cryostat sections of EBs for ISL1, HB9 and NFL. Scale bar: 100µm. (B) Quantification of the percentage of motor neurons following exposure to FGF 120 ng/ml for different duration (C) Quantification of the percentage of the co-expression of HOXC6/HOXC8/ISL1 and HOXC9/HOXC8/ISL1 in the same conditions. (D-E) Immunostaining on cryostat sections of EBs. Representative images of the co-expression of ISL1, SCIP and FOXP1 and HOXC8/HOXC9/SCIP and ISL1 in the two indicated conditions. (F) Quantification of the percentage of FOXP1/SCIP double positive cells using FCS software. (G) Immunostaining on cryostat sections of EBs for ISL1, HOXC6, HOXC8 and HOXC9 following addition of different concentrations of FGF2. (H) Immunostaining for ISL1, HOXC6, HOXC8, HOXC9 in RA D3-9/SAG D4-9 condition and the same condition with 120 ng/ml FGF8 D3-9.



**Figure S6) FGF GDF11 cooperates to induce caudal thoracic and lumbar motor neurons** (A) Quantification of the percentage of motor neurons following exposure upon addition of GDF11 for different duration. (B) Immunostaining on cryostat sections of EBs for ISL1, HB9 and NFL upon addition of FGF2 120 ng/ml and GDF11 25 ng/ml for different duration. (C) Quantification of the percentage of motor neurons upon addition of FGF2/GDF11 for different duration. (D) Representative images of immunostaining for ISL1, HOXC9 and HOXC10 in the indicated conditions. (E) Quantification of the percentage of HOX coexpression upon addition of FGF2/GDF11 for different duration. Scale bars: 100µm



**Figure S7) Model for the control of progenitor temporal fate patterning**

**Table S1. Statistical analysis**

Figure	Conditions	Statistical analysis	Value compared	Significant? P < 0.05?	Summary * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001
Figure 2- E	D3 vs D4	Kruskal-Wallis test	HOXC6	No	ns
	D3 vs D5			No	ns
	D3 vs D6			Yes	**
	D3 vs D7			Yes	***
	D4 vs D5			No	ns
	D4 vs D6			Yes	*
	D4 vs D7			Yes	***
	D5 vs D6			No	ns
	D5 vs D7			No	ns
	D6 vs D7			No	ns
	D3 vs D4	Kruskal-Wallis test	HOXC8	No	ns
	D3 vs D5			No	ns
	D3 vs D6			Yes	**
	D3 vs D7			Yes	***
	D4 vs D5			No	ns
	D4 vs D6			No	ns
	D4 vs D7			No	ns
	D5 vs D6			No	ns
	D5 vs D7			No	ns
	D6 vs D7			No	ns
	D3 vs D4	Kruskal-Wallis test	HOXC9	No	ns
	D3 vs D5			No	ns
	D3 vs D6			Yes	**
	D3 vs D7			Yes	***
	D4 vs D5			No	ns
	D4 vs D6			No	ns
	D4 vs D7			Yes	**
	D5 vs D6			No	ns
	D5 vs D7			No	ns
	D6 vs D7			No	ns
Figure 2- F	D3 vs D4	Kruskal-Wallis test	HOXC6HOXC8	No	ns
	D3 vs D5			No	ns
	D3 vs D6			No	ns
	D3 vs D7			No	ns
	D4 vs D5			No	ns
	D4 vs D6			Yes	*
	D4 vs D7			Yes	**
	D5 vs D6			No	ns
	D5 vs D7			No	ns
	D6 vs D7			No	ns

Figure 2- F	D3 vs D4	Kruskal- Wallis test	HOXC8HOXC9	No	ns		
	D3 vs D5			No	ns		
	D3 vs D6			No	ns		
	D3 vs D7			Yes	**		
	D4 vs D5			No	ns		
	D4 vs D6			No	ns		
	D4 vs D7			Yes	**		
	D5 vs D6			No	ns		
	D5 vs D7			No	ns		
	D6 vs D7			No	ns		
Figure 2- G	D3 vs D4	Kruskal- Wallis test	FOXP1	No	ns		
	D3 vs D5			No	ns		
	D3 vs D6			No	ns		
	D3 vs D7			No	ns		
	D4 vs D5			No	ns		
	D4 vs D6			No	ns		
	D4 vs D7			No	ns		
	D5 vs D6			No	ns		
	D5 vs D7			No	ns		
	D6 vs D7			No	ns		
	D3 vs D4	Kruskal- Wallis test	FOXP1SCIP	No	ns		
	D3 vs D5			No	ns		
	D3 vs D6			No	ns		
	D3 vs D7			No	ns		
	D4 vs D5			No	ns		
	D4 vs D6			No	ns		
	D4 vs D7			Yes	*		
	D5 vs D6			No	ns		
	D5 vs D7			No	ns		
	D6 vs D7			No	ns		
Figure 4- C	RA D3 vs RA D7	Kruskal- Wallis test	HOXC6	No	ns		
	RA D3 vs D3-D7 PD32			No	ns		
	RA D3 vs D3-D7 PD173074			No	ns		
	RA D7 vs D3-D7 PD32			No	ns		
	RA D7 vs D3-D7 PD173074			No	ns		
	D3-D7PD32 vs D3-D7 PD173074			No	ns		
	RA D3 vs RA D7			Kruskal- Wallis test	HOXC8	No	ns
	RA D3 vs D3-D7 PD32					No	ns
	RA D3 vs D3-D7 PD173074					No	ns
	RA D7 vs D3-D7 PD32					Yes	*
RA D7 vs D3-D7 PD173074	No	ns					
D3-D7PD32 vs D3-D7 PD173074	No	ns					
Figure 4- D	D3 NT vs. D4 NT	Kruskal- Wallis test	HOXC5	No	ns		
	D3 NT vs. D5			No	ns		
	D3 NT vs. D4 PD32			No	ns		
	D3 NT vs. D5 PD32			No	ns		
	D4 NT vs. D5			No	ns		

Figure 4-D	D4 NT vs. D4 PD32	Kruskal-Wallis test	HOXC5	Yes	*
	D4 NT vs. D5 PD32			Yes	ns
	D5 vs. D4 PD32			Yes	*
	D5 vs. D5 PD32			No	ns
	D4 PD32 vs. D5 PD32			No	ns
	D3 NT vs. D4 NT	Kruskal-Wallis test	HOXC6	No	ns
	D3 NT vs. D5			No	ns
	D3 NT vs. D4 PD32			No	ns
	D3 NT vs. D5 PD32			No	ns
	D4 NT vs. D5			No	ns
	D4 NT vs. D4 PD32			Yes	**
	D4 NT vs. D5 PD32			No	ns
	D5 vs. D4 PD32			Yes	**
	D5 vs. D5 PD32			Yes	*
	D4 PD32 vs. D5 PD32			No	ns
	D3 NT vs. D4 NT	Kruskal-Wallis test	HOXC8	No	ns
	D3 NT vs. D5			No	ns
	D3 NT vs. D4 PD32			No	ns
	D3 NT vs. D5 PD32			No	ns
	D4 NT vs. D5			No	ns
D4 NT vs. D4 PD32	Yes			*	
D4 NT vs. D5 PD32	Yes			*	
D5 vs. D4 PD32	Yes			**	
D5 vs. D5 PD32	No			ns	
D4 PD32 vs. D5 PD32	No			ns	
D3 NT vs. D4 NT	Kruskal-Wallis test	HOXC9	Yes	*	
D3 NT vs. D5			Yes	**	
D3 NT vs. D4 PD32			No	ns	
D3 NT vs. D5 PD32			No	ns	
D4 NT vs. D5			No	ns	
D4 NT vs. D4 PD32			No	ns	
D4 NT vs. D5 PD32			No	ns	
D5 vs. D4 PD32			Yes	*	
D5 vs. D5 PD32			No	ns	
D4 PD32 vs. D5 PD32			No	ns	
Figure 5-B	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC6	No	ns
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D9			Yes	**
	RA FGF D3-D5 vs RA FGF D3-D9			No	ns

Figure 5-B	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC8	No	ns		
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D9			No	ns		
	RA FGF D3-D5 vs RA FGF D3-D9			No	ns		
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D5			Yes	**		
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D9			No	ns		
	RA FGF D3-D5 vs RA FGF D3-D9			No	ns		
Figure 5-C	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D5	Kruskal-Wallis test	FOXP1	No	ns		
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D9			Yes	*		
	RA FGF D3-D5 vs RA FGF D3-D9			No	ns		
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D5			No	ns		
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D9			Yes	*		
	RA FGF D3-D5 vs RA FGF D3-D9			No	ns		
Figure 5-D	5 ng/ml vs 15 ng/ml	Kruskal-Wallis test	HOXC6	No	ns		
	5 ng/ml vs 30 ng/ml			No	ns		
	5 ng/ml vs 60 ng/ml			No	ns		
	5 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns		
	15 ng/ml vs 30 ng/ml			No	ns		
	15 ng/ml vs 60 ng/ml			No	ns		
	15 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns		
	30 ng/ml vs 60 ng/ml			No	ns		
	30 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns		
	60 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns		
	5 ng/ml vs 15 ng/ml			Kruskal-Wallis test	HOXC8	No	ns
	5 ng/ml vs 30 ng/ml					No	ns
	5 ng/ml vs 60 ng/ml					No	ns
	5 ng/ml vs 120 ng/ml					No	ns
15 ng/ml vs 30 ng/ml	No	ns					
15 ng/ml vs 60 ng/ml	No	ns					

Figure 5-D	15 ng/ml vs 60 ng/ml	Kruskal-Wallis test	HOXC8	No	ns
	15 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns
	30 ng/ml vs 60 ng/ml			No	ns
	30 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns
	60 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns
	5 ng/ml vs 15 ng/ml	Kruskal-Wallis test	HOXC9	No	ns
	5 ng/ml vs 30 ng/ml			No	ns
	5 ng/ml vs 60 ng/ml			No	ns
	5 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns
	15 ng/ml vs 30 ng/ml			No	ns
	15 ng/ml vs 60 ng/ml			No	ns
	15 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns
	30 ng/ml vs 60 ng/ml			No	ns
	30 ng/ml vs 120 ng/ml			No	ns
60 ng/ml vs 120 ng/ml	No	ns			
Figure 6-D	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC6	No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D9			Yes	*
	RA FGF GDF11 D3-D5 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC8	Yes	*
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D5 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC9	No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D5 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXD9	No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns

Figure 6-D	RA FGF GDF11 D3-D5 vs RA FGF GDF11 D3-D9	Kruskal-Wallis test	HOXD9	No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC10	No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D9			Yes	*
	RA FGF GDF11 D3-D5 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
Figure S2-H	RA D3-D9 vs RA D4-D9	Kruskal-Wallis test	HOXC6	No	ns
	RA D3-D9 vs RA D5-D9			No	ns
	RA D4-D9 vs RA D5-D9			No	ns
	RA D3-D9 vs RA D4-D9	Kruskal-Wallis test	HOXC8	No	ns
	RA D3-D9 vs RA D5-D9			Yes	**
	RA D4-D9 vs RA D5-D9			No	ns
Figure S5-C	RA D3-D9 vs RA D4-D9	Kruskal-Wallis test	HOXC9	No	ns
	RA D3-D9 vs RA D5-D9			No	ns
	RA D4-D9 vs RA D5-D9			No	ns
Figure S5-C	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC6 HOXC8	No	ns
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D9			Yes	**
	RA FGF D3-D5 vs RA FGF D3-D9			No	ns
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC8 HOXC9	Yes	*
	RA FGF D3-D4 vs RA FGF D3-D9			No	ns
	RA FGF D3-D5 vs RA FGF D3-D9			No	ns
Figure S6-E	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D5	Kruskal-Wallis test	HOXC6 HOXC8	No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D5 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns

Figure S6-E	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D5	Kruskal- Wallis test	HOXC8 HOXC9	No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D5 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D5	Kruskal- Wallis test	HOXC9 HOXC10	No	ns
	RA FGF GDF11 D3-D4 vs RA FGF GDF11 D3-D9			Yes	*
	RA FGF GDF11 D3-D5 vs RA FGF GDF11 D3-D9			No	ns

## IV. Discussion

Lors de ce travail de thèse, j'ai cherché à déterminer les mécanismes impliqués dans la régulation des changements de compétence des progéniteurs axiaux humains incluant l'induction colinéaire temporelle des gènes pour comprendre les mécanismes gouvernant la formation de la diversité motoneuronale humaine. Pour ce faire, j'ai d'abord caractérisé des combinatoires de facteurs de transcription définissant des populations de MNs présentes le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière embryonnaire humaine. Grâce à ces marqueurs, j'ai montré qu'il était possible de générer, à partir de CSPh, des progéniteurs ayant les caractéristiques de progéniteurs axiaux comme indiqué par leur capacité à donner d'abord naissance à des MNs cervicaux puis, au fur et à mesure que les progéniteurs vieillissent, à des MNs présents dans des régions de plus en plus caudales de l'embryon. Des analyses du transcriptome des progéniteurs, à différents temps, couplées à des expériences de perte et de gain de fonction m'ont permis de mettre en évidence un rôle clé de la signalisation FGF endogène aux progéniteurs, dans le contrôle de la temporalité des changements de compétence des progéniteurs axiaux. La manipulation de cette voie de signalisation permet alors d'accélérer ou de ralentir l'horloge des progéniteurs pour ainsi contrôler la spécification de multiples types de MNs et, entre autres, de MNs ayant les caractéristiques de neurones innervant spécifiquement les mains. Dans l'ensemble, mes résultats montrent la possibilité de générer des progéniteurs axiaux humains qui récapitulent *in vitro* des séquences complexes de changements de compétence. Ce modèle m'a permis d'isoler un facteur contrôlant la vitesse de l'horloge de ces progéniteurs. La manipulation de ce facteur permet de cibler précisément la différenciation des CSPhs en des populations précises de motoneurones.

### A. Identification du code HOX dans les MNs spinaux le long de l'axe rostro-caudal chez l'Homme.

Avant nos travaux, l'identification via le profil HOX de l'identité R-C des MNs générés se limitait à la spécification de MNs HOXA5+. A l'exception d'une étude (Li et al., 2005), les études ayant défini les MNs caudaux par l'expression des gènes *HOX* se sont limitées à étudier l'expression des ARNm et non des protéines, or l'expression des ARNm et des protéines est différée dans le temps dans l'embryon (Dasen et al., 2003; Li et al., 2017)

L'absence de travaux sur les domaines d'expression des protéines HOX dans les MNs de l'embryon humain empêchait de confirmer l'identité des MNs générés *in vitro*. Aucune étude n'avait

démontré que les domaines d'expression des HOX observés chez la souris et le poulet étaient conservés chez l'Homme. L'analyse détaillée du profil d'expression des HOX à partir de la moelle épinière d'embryon humain au stade de 6,3 semaines de gestation m'a permis de définir les domaines d'expression des protéines HOXA5/HOXC5-HOXC10. De plus, l'analyse des domaines d'expression des HOX chez l'embryon humain au stade 7,5 semaines de gestation, réalisée par Gist Croft, complète mes études. Ces deux analyses suggèrent que les domaines d'expression des HOX sont globalement conservés entre l'Homme et la souris, ainsi que la répartition des MNs des CLM et leur sous-division en CLMm et CLMI (Dasen et al., 2005).

## B. Mécanismes des changements temporels de compétence des progéniteurs axiaux

### 1. Génération de progéniteurs axiaux à partir de cellules souches pluripotentes humaines

J'ai montré qu'en présence d'un activateur de la voie WNT et d'inhibiteurs des voies TGF $\beta$  et BMPs, des corps embryonnaires formés par l'agrégation de cellules pluripotentes humaines forment des progéniteurs axiaux. En effet, ces cellules sont capables de donner naissance à de multiples types de motoneurones (MNs) présents *in vivo* à différents niveaux axiaux de la moelle épinière. Ils génèrent d'abord des MNs cervicaux puis en vieillissant des MNs de plus en plus caudaux.

De plus au jour 2/3 de la différenciation l'ensemble de ces progéniteurs expriment SOX2, CDX2 et BRA à un faible niveau (Figure 3B, S2G, 3B, résultat). Comme énoncé dans l'introduction, ce profil CDX2+/SOX2+/BRA+ définit les progéniteurs neuromésodermaux (PNM) à l'origine de la formation de la moelle épinière et des somites dans les embryons de souris (Henrique et al., 2015). De plus, la comparaison avec des études transcriptomiques récentes réalisées sur des PNMs de souris montrent une forte similarité entre les gènes exprimés dans les PNMs et dans les progéniteurs humains générés au jour 2 et 3 de différenciation (Figure 3.A-C, résultats). Ainsi, il semblerait que les cellules générées *in vitro* ressemblent aux PNMs, et mon travail apporte une description plus complète que ce qui a été préalablement réalisé dans d'autres études (Lippmann et al., 2015; Verrier et al., 2018). La faible expression de BRA dans les cellules générées *in vitro* selon notre protocole peut être liée au fait qu'*in vivo*, les cellules dites PNMs représentent un continuum de cellules exprimant avec un niveau inverse les gènes *Sox2* et *Bra* selon leur position. Les PNMs exprimant faiblement *Bra* s'engagent préférentiellement vers le destin neuronal sont localisées *in vivo* dans la zone antérieure de l'épiblaste caudal latéral et leur identité pourrait correspondre à celle des cellules progénitrices que j'ai obtenu

*in vitro* (Figure 20, introduction) (Wymeersch et al., 2019, 2016). Enfin, j'ai montré que ces cellules activent séquentiellement les gènes *HOX* au cours du temps ce qui est observé aussi dans les progéniteurs neuromésodermaux *in vivo* et qui a été proposé comme étant le début de la mise en place des profils d'expression des facteurs de transcription *HOX*.

De manière importante, ceci montre que l'activation des *HOX* et l'acquisition d'une identité rostro-caudale précède donc en partie l'induction neurale. Ceci complète des résultats récents mettant en évidence chez la souris que l'acquisition des destins « système nerveux antérieur » versus « moelle épinière » a lieu avant l'induction neurale. Ceci entre en contradiction avec les modèles antérieurs proposant une induction neurale avec acquisition d'un destin neural antérieur par défaut puis une caudalisation de la plaque neurale jusqu'à la moelle épinière (Metzis et al., 2018; Stern et al., 2006). Nos données suggèrent que cette règle pourrait prévaloir aussi pour les domaines de la moelle épinière avec d'abord une acquisition du code *HOX* puis une neuralisation. Dans tous les cas, ceci remet en cause les stratégies envisagées préalablement pour générer *in vitro* les MNs caudaux (Davis-Dusenbery et al., 2014). De plus, dans mes expériences, l'activation de la voie *WNT* antagonise la spécification des MNs cervicaux *HOXA5+* (Figure 2A-B). Ces différences posent alors la question l'origine des MNs cervicaux (Figure 2A-B, résultat) à savoir : dérivent-ils des cellules progénitrices de la plaque neurale antérieure et alors appartiendraient-ils plutôt au tronc cérébral ou sont-ils réellement dérivés des progéniteurs axiaux donnant le reste de la moelle épinière ?

## 2. Le changement de compétence des progéniteurs axiaux advient indépendamment de sources extrinsèques de FGF.

Les expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* sur la souris et le poulet montrent qu'une source extrinsèque de FGF et de GDF11 a un effet sur l'expression des *Hox* et permet la caudalisation des progéniteurs de MNs ou bien la spécification de MNs thoraciques ou lombaires (Dasen et al., 2003; J. P. Liu et al., 2001; Liu, 2006). *In vivo* la zone contenant les progéniteurs axiaux est exposée aux FGFs provenant des différentes cellules de la région caudale de l'embryon mais aussi sécrétés par les somites et les progéniteurs préneuraux. Plus tard les cellules de cette région caudale expriment aussi le GDF11 (Lee et al., 2010; Liu, 2006). La multiplicité des sources produisant ces molécules a rendu difficile la détermination de la source principale agissant sur les progéniteurs axiaux. La différenciation ciblée de cellules souches pluripotentes représente un excellent modèle pour s'affranchir de l'effet des tissus adjacents et offre la possibilité de mieux comprendre les mécanismes intrinsèques régulant les changements de compétence des progéniteurs axiaux. En produisant des progéniteurs ayant les propriétés de progéniteurs axiaux (capacité à donner de multiples types de neurones se trouvant à

différents niveaux de l'axe rostro-caudal, transcriptome ressemblant à celui des cellules axiales neuromésodermes de souris), j'ai pu montrer que ces cellules possèdent une horloge conduisant à leur changement de compétence progressive au cours du temps sans ajout de FGFs ou de GDF11 extrinsèques. En effet, les progéniteurs axiaux humains changent de compétence au cours du temps en l'absence de FGFs ou de GDF11 exogène (Figure 2, résultat) comme démontré par leur capacité à donner naissance à des MNs d'identité de plus en plus caudale. De plus nous avons observé une activation colinéaire temporelle des gènes *HOX* en accord avec ce qui est observé *in vivo* et démontré dans des modèles de progéniteurs neuromésodermaux préalablement développés (Gouti et al., 2017, 2014; Wymeersch et al., 2019). Ce modèle de spécification R-C semble corrélérer avec le développement *in vivo*. En effet, *in vivo* les progéniteurs axiaux s'auto renouvellent tout en changeant d'identité. Ils sont exposés plus tard à l'acide rétinoïque sécrété par les somites et donnent naissance à des MNs caudaux (Gouti et al., 2015; Wymeersch et al., 2019). Ainsi mes résultats démontrent que les progéniteurs générés *in vitro* constituant des EB changent d'identité au cours du temps, indépendamment d'une source extrinsèque de FGF/GDF11, induisent progressivement l'expression des gènes *HOX* qui contrôlent la spécification des identités neuronales de plus en plus caudales. Cela permet de reproduire les caractéristiques de progéniteurs axiaux de présents dans les embryons de vertébrés, incluant très probablement les embryons humains comme le montre la présence de cellules coexprimant SOX2 et BRACHYURY dans la région caudale d'embryons humains (Gouti et al., 2017; Wymeersch et al., 2016).

### 3. Des facteurs sécrétés intrinsèques aux progéniteurs régulent leurs changements de compétence.

Ce modèle m'a permis d'aborder les mécanismes régulant les changements temporels de compétence des progéniteurs en absence de tissus périphériques. Comme suggéré par les profils d'expression des FGFs dans les embryons de souris et poulet, mes études du transcriptome des progéniteurs générés *in vitro* montrent que ces cellules produisent elles-mêmes des FGFs et que la signalisation par cette voie augmente au cours du temps comme montré par l'augmentation progressive de l'expression de cibles de la voie FGF. Dans les expériences d'inhibition des récepteurs FGFR1 et 3 ou de la voie intracellulaire en aval de FGF passant par la kinase MEK1/2, montrent que la production de FGF endogène est nécessaire pour contrôler les changements de compétence. Le transcriptome montre une activation des cibles de la voie FGF et des ligands FGF8 et 17 au cours du temps suggérant qu'une augmentation de cette signalisation pourrait contrôler l'évolution de la séquence. En accord, l'augmentation de la signalisation de la voie FGF par ajout extrinsèque de FGF2 provoque une activation précoce des gènes *HOX* dans les progéniteurs et une caudalisation de

l'identité des MNs montrant que le FGF régule le changement de compétence et peut accélérer ce changement. Le FGF intrinsèque aux progéniteurs régule donc la vitesse de l'horloge de ces cellules. Si le FGF8 et le FGF17 qui sont fortement exprimés par les progéniteurs semblent les meilleurs candidats il reste que les ligands FGFs responsables de l'activation des récepteurs FGFs dans mon modèle sont à déterminer. Une des stratégies possibles est l'inhibition via des anticorps bloquants spécifiques de certains FGFs pour déterminer ceux nécessaires au changement de compétence.

Néanmoins, dans mon modèle de différenciation *in vitro*, en l'absence d'une combinatoire de FGF2 et de GDF11, les cellules progénitrices ne sont pas capables de se différencier en MNs présentant des identités plus caudales que la partie antérieure du domaine thoracique (HOXC8+/HOXC9+) suggérant que dans notre système les cellules ne portent pas de manière intrinsèque l'ensemble des mécanismes contrôlant l'horloge de changement de compétence. Pourtant, de manière très intéressante, le transcriptome en accord avec les données d'expression *in vivo* dans les embryons (Liu, 2006) montre que les progéniteurs expriment de manière endogène le GDF11 suggérant qu'elles portent en elles les mécanismes de l'horloge tardive permettant la spécification des MNs les plus caudaux (lombaires et sacrés). Nos données montrant que les progéniteurs produits à partir de CSPH perdent progressivement certaines des caractéristiques des progéniteurs axiaux pour exprimer de plus en plus de marqueurs de la zone préneurale, il est possible que les mécanismes de régulation tardifs ne se mettent pas en place correctement dans notre système. Trouver les conditions permettant de maintenir un pool de progéniteurs conservant toutes les caractéristiques des progéniteurs à plus long terme permettra de déterminer si les cellules axiales portent l'ensemble des mécanismes régulant leur compétence ou bien si le GDF11 doit nécessairement être produit par d'autres cellules avoisinantes.

Aussi nos résultats n'excluent pas la nécessité de l'activation de la voie WNT qui est impliquée dans l'élongation axiale et l'initiation des *Hox* (Metzis et al., 2018; Neijts et al., 2016; Nordström et al., 2006, 2002; Shimizu et al., 2005; Young et al., 2009). Dans nos expériences *WNT8A* est exprimée par les progéniteurs axiaux. Ainsi, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la voie WNT, il serait intéressant de déterminer si tout comme la voie FGF, la voie WNT est également activée de manière endogène par les cellules progénitrices pour réguler l'identité rostro-caudale des progéniteurs.

L'évolution temporelle de l'identité des progéniteurs est également observée dans les modèles de culture des structures complexes en 3D notamment dans les gastruloïdes, où l'expression colinéaire temporelle des *Hox* est aussi observée en parallèle d'une élongation des structures pour former un axe antéro-postérieur. Cependant en contraste avec notre étude, dans ces structures une ségrégation spatiale des domaines *Hox* est observée suggérant que l'élongation est le mécanisme de mise en place de patterns spatiaux d'expression des HOXs après leur activation (Beccari et al., 2018). Ainsi, il serait

intéressant de comparer ces deux modèles afin de mieux identifier quelles sont les voies de signalisation activées dans ces cultures et comment elles régulent l'identité temporelle.

Plus largement, nos résultats suggèrent que dans un modèle de neurogenèse temporelle, la dynamique de l'horloge pourrait être régulée par des facteurs sécrétés intrinsèques au lignage. Or ce mécanisme de neurogenèse temporelle à partir d'un pool de progéniteurs est très utilisé dans le système nerveux. Les exemples les mieux décrits étant la genèse des différents types cellulaires du cortex ou de la rétine. La source de ces facteurs modulant la neurogenèse temporelle n'a souvent pas été déterminée ; ces facteurs étant généralement exprimés par plusieurs types cellulaires dans la région. Il serait donc très intéressant de déterminer si la source de ces facteurs vient des progéniteurs eux-mêmes et si ce modèle de production de facteurs sécrétés par les progéniteurs eux-mêmes pour changer leur compétence pourrait être étendu à d'autres systèmes.

### C. Mode d'Intégration des signaux extrinsèques par les progéniteurs pour générer la diversité rostro-caudale.

Mes résultats montrent que l'exposition de cellules progénitrices axiales à une source extrinsèque de FGF et de GDF11 régule positivement l'expression des gènes *HOXC6-HOXC10* et favorisent la spécification de MNs d'identité brachiale, thoracique ou lombaire. Mes résultats montrent que les progéniteurs axiaux sont capables d'intégrer les paramètres de temps et de concentration lors de leur exposition au FGF en générant des MNs de plus en plus caudaux proportionnellement à l'augmentation de la durée d'exposition ou de la concentration de FGF.

#### 1. Notion d'intégration d'un facteur selon sa concentration Vs son temps

Des études sur Shh ont déjà démontré l'importance de l'intégration des durées et concentrations dans la spécification des identités neuronales (Dessaud et al., 2010, 2007). Ces études ont montré que Shh permet de spécifier progressivement les progéniteurs du tube neural en leur conférant une identité ventrale en fonction de sa concentration ou de sa durée. A partir de mes résultats, j'ai pu observer que l'exposition des cellules progénitrices à une concentration croissante de FGF ou une plus longue durée permet la spécification de MNs de plus en plus caudaux (Figure 5, résultats). Ces résultats confirment l'effet de la concentration de FGF sur la caudalisation des MNs *in vitro* sur des explants de tube neural de poulet (Liu et al., 2001). *In vivo*, une augmentation progressive

de l'expression de FGF8 dans la partie caudale des embryons de poulet (Liu et al, 1998) est observée. Aussi, plus les progéniteurs axiaux restent dans la région caudale plus ils sont exposés longtemps à cette molécule. Il semble donc probable que *in vivo* les cellules intègrent aussi les deux aspects durée et concentration. Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de déterminer comment les cellules intègrent ces deux paramètres par exemple en étudiant la dynamique des voies de signalisation activées et des programmes transcriptionnels en aval.

## 2. Notion de temporalité : régulation de l'identité rostro-caudale au cours du temps

Le protocole développé par Maury et al., 2015 a été intéressant dans un premier temps de par son efficacité et sa rapidité. En effet, 14 jours sont suffisants pour passer d'une identité CSP vers une identité de MNS post-mitotiques avec une temporalité proche de celle observée *in vivo* (les CSPh sont l'équivalent de cellules souches de l'embryon post-implantatoire vers les jours 11 à 15 de gestation et les premiers MNS apparaissent vers les jours 26-30). En revanche, mes résultats ont mis en évidence la possibilité de générer *in vitro* de manière synchrone des MNS cervicaux, brachiaux au lombaires qui naissent normalement à des temps différents *in vivo* (Bayer and Altman, 2002). Via l'analyse de l'expression des gènes *HOX* dans les progéniteurs exposés au FGF ou au FGF et au GDF11 au 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour de différenciation, j'ai pu observer une expression précoce des gènes *HOX* caudaux du domaine thoracique (*HOXD9*) et lombaire (*HOXC10*) (Figures 5E, 6C, résultats). Ainsi l'activité combinatoire des facteurs FGF et GDF11 permet d'accélérer l'induction des gènes *HOX* dans les progéniteurs conduisant à la spécification prématurée de progéniteurs normalement générés plus tard *in vivo*. La différenciation de ces progéniteurs suivant une dynamique similaire, les MNS apparaissent ensuite à 14 jours. C'est donc en jouant sur la dynamique de l'horloge de compétence des progéniteurs axiaux que l'on peut accélérer ce processus. Cette accélération temporelle pourrait passer par une action permissive des molécules FGFs ou GDF11 ou par une action directe sur l'activation des complexes *HOX*. Par exemple il pourrait y avoir un changement dans un processus cellulaire qui est régulateur de la compétence comme une accélération du cycle cellulaire qui serait une composante de l'horloge. Cette hypothèse pourrait être étudiée en utilisant un inhibiteur de cycline (impliqué dans le cycle cellulaire) pour bloquer le cycle cellulaire (Golias et al., 2004). Cependant, une étude sur les neurones corticaux montre que la régulation de la neurogenèse temporelle corticale se fait indépendamment du cycle cellulaire (Okamoto et al., 2016). Une autre hypothèse serait que les facteurs soient capables de directement activer la transcription des gènes *HOX*.

Mes résultats, couplés à des études antérieures montrent que le rôle des facteurs WNT, FGF, GDF11, AR pour contrôler la spécification des différents sous-types de MNS est conservé entre les vertébrés (au moins chez l'Homme, la souris, le poulet, et le zebrafish). Cependant, la vitesse de

génération, des MNs et de leurs sous-types varie entre les espèces, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* (Marklund et al., 2014). Bien que les facteurs régulant la formation des MNs et leur identité R-C soient les mêmes entre les espèces, les différents mécanismes qui sous-tendent la différence de temporalité restent méconnus. Dans un premier temps, il serait intéressant de déterminer si ce contrôle temporel de différenciation est intrinsèque aux cellules de chaque espèce. Pour cela, on pourrait envisager de réaliser des greffes de cellules progénitrices humaines au stade PNM taguées, HB9-GFP par exemple (Wichterle et al., 2002), dans la zone souche caudale d'embryon de souris (Amoroso et al., 2013; Cambray and Wilson, 2007; Pepper et al., 2017). En effet, si dans ces conditions, les MNs dérivés de progéniteurs humains sont capables d'acquérir une identité R-C similaire aux cellules environnantes, alors cela suggérerait que le contrôle de la temporalité de la différenciation des MNs entre l'espèce humaine et murine passe par des mécanismes extrinsèques.

#### D. Les motoneurones différenciés *in vitro* comme outils d'étude du développement et des maladies

L'accès à différents sous-types de MNs humains *in vitro* est un moyen d'accéder à une population rare de MNs et représente le seul modèle existant pour étudier le développement ou étudier les mécanismes des maladies dans un contexte humain. Ces études sont un moyen de confirmer les points communs ou de révéler les différences pouvant exister entre les espèces, en s'appuyant sur la comparaison avec des études effectuées jusqu'à présent dans des modèles animaux.

##### 1. Etudes développementales

###### a) Caractérisation des sous-types de motoneurones générés *in vitro*

Il est possible de caractériser l'identité des MNs générés *in vitro* via leur profil d'expression des HOX. Par immunomarquage dirigé contre les HOX, j'ai pu mettre en évidence la spécification de différentes sous-populations de MNs correspondant aux populations de MNS des domaines cervical, brachial, thoracique ou lombaire le long de l'axe R-C. De plus, dans les différentes conditions de différenciation, la grande majorité des neurones moteurs dérivés des CSPi présentent une expression mutuellement exclusive de HOXC6 avec HOXC9, ce qui correspond à la réciprocity d'expression de ces paires de protéines Hox observées *in vivo* (Dasen et al., 2003; Lacombe et al., 2013). Le rôle des HOX dans l'acquisition de l'identité des MNs passe en partie par l'organisation des MNs en colonnes et en

pools (Lacombe et al., 2013). Les résultats que j'ai obtenus mettent en évidence que les MNs différenciés dans les conditions générant les MNs HOXC6+/HOXC8+ possèdent les caractéristiques associées *in vivo* aux MNs de la CML (FOXP1) et présentent également les marqueurs de pool (SCIP). Ainsi, on peut considérer que la capacité des HOX à gouverner l'acquisition de l'identité des MNs est conservé dans le modèle humain et *in vitro*.

L'accès aux sous-populations de MNs à partir d'embryons est difficile, que ce soit chez l'humain ou dans des modèles animaux, limitant ainsi la caractérisation moléculaire et fonctionnelle des sous-types de MNs. Leur génération *in vitro* est un moyen de pouvoir caractériser cet ensemble de populations rares de cellules humaines en particulier pour déterminer leurs propriétés électrophysiologiques ou encore leur profil d'expression de gènes. Par la suite, il serait envisageable de réaliser des greffes des sous-types de MNs dérivés de CSPi dans des embryons murins ou de poulet pour déterminer si, comme les MNs murins dérivés de cellules souches embryonnaires, ils sont capables d'innervier sélectivement leurs muscles cibles et de former des jonctions neuromusculaires (Peljto et al., 2010; Pepper et al., 2017; Trawczynski et al., 2019). Ces expériences permettraient de valider en partie la fonctionnalité des MNs obtenus dans mes travaux. En effet, la trajectoire axonale est une des principales caractéristiques fonctionnelles précoces des sous-types de motoneurones.

Dans un second temps, l'utilisation des techniques de séquençage ARN pour les différentes populations de MNs est une approche intéressante pour caractériser le transcriptome de chaque sous-type de MNs chez l'Homme et identifier les différences d'expression de gènes selon les différents sous-types.

#### b) [Evolution de la structure chromatinienne dans les clusters HOX dans notre modèle \*in vitro\*.](#)

L'organisation des gènes *Hox* sous forme de clusters est conservée dans les espèces exprimant les *Hox* de manière colinéaire au niveau spatial et temporel et dont le corps se forme progressivement par allongement axial. Les mécanismes conduisant à l'induction progressive des *Hox* le long des clusters restent encore controversés. Un mécanisme passant par l'ouverture graduelle d'une structure chromatinienne condensée a été le premier modèle proposé pour expliquer ce phénomène (Kmita and Duboule, 2003). Lors de l'extension de l'embryon, il a été montré que les marques H3K27me3 des histones qui correspondent à des régions non exprimées sont présentes tout le long des clusters des *Hox*, et sont progressivement retirées de 3' vers 5' au cours du temps (Soshnikova and Duboule, 2009). Cependant, les mécanismes contrôlant l'ouverture progressive de la chromatine au cours du temps

sont encore peu connus et soulèvent la question de la causalité : les domaines ouverts/fermés de la chromatine définissent-ils l'expression et le maintien de l'expression des gènes *Hox* ? Ou à l'inverse, est-ce que la modification de la structure de la chromatine est la conséquence du mécanisme transcriptionnel activé pour l'expression des gènes *Hox* ? En parallèle un autre modèle d'ouverture de la chromatine a été suggéré et repose sur l'expression discrète des facteurs impliqués dans l'élongation axiale et la spécification des MNs qui contrôleraient l'ouverture de la chromatine de manière saltatoire (Mazzoni et al., 2013). Parmi ces facteurs, l'AR et CDX2 permettraient l'ouverture de la chromatine avant l'expression séquentielle des *Hox* qui serait-elle induite par des séquences régulatrices présentes en amont de chacun des gènes (Mahony et al., 2011; Mazzoni et al., 2013; Neijts et al., 2017). Mes travaux permettent pour la première fois de générer un système de différenciation où il est possible d'étudier l'état de la chromatine dans toutes les étapes de la différenciation : des cellules souche aux différents types de MNs peuplant la moelle épinière. Grâce à cette méthode rapide et fiable permettant d'obtenir la plupart des MNs recouvrant l'axe R-C de la moelle épinière, il serait intéressant d'analyser l'évolution de la structure de la chromatine dans les progéniteurs axiaux humains au cours du temps par Chip-seq ou ATAC-seq (Amin et al., 2016; Neijts et al., 2017; Noordermeer et al., 2011). Ceci pourrait permettre de mieux caractériser le modèle d'ouverture de la chromatine dans les clusters *HOX* lors de l'élongation de la moelle épinière. Est-ce que la structure chromatinienne est ouverte dès le jour 1 ou 2 de différenciation ou se fait elle progressivement ? Quel est l'impact des facteurs FGF/GDF11 ? Ainsi nous pourrions mieux comprendre si l'ouverture de la chromatine et l'expression séquentielle des *Hox* est dépendante de cette notion de temporalité et/ou d'un programme transcriptionnel activé par des facteurs extrinsèques.

### c) Etude de la formation des jonctions neuromusculaires

Avec la différenciation de MNs dérivés de CSPh, l'étude *in vitro* des jonctions neuromusculaires chez l'humain est devenue possible grâce à la coculture de jonctions neuromusculaires à partir de MNs dérivés de CSPh et de myotubes (Marteyn et al., 2011). Cependant, à partir de mon protocole, il est possible pour la première fois d'étudier la mise en place des jonctions neuromusculaires chez l'humain et déterminer si elles présentent des propriétés moléculaires et fonctionnelles différentes selon la coculture des myoblastes avec des MNs spinaux d'identités R-C différentes. De plus, la coculture *in vitro* des MNs et des myoblastes dans des micro-chip confine ces deux populations cellulaires dans deux compartiments et permet leur connexion par projection axonale des MNs.

Cette forme de culture est un moyen d'étudier les transports antérogrades des MNs en réponse aux facteurs sécrétés par les myotubes.

Ces cocultures pourraient donner accès à la modélisation de diverses unités motrices retrouvées le long de l'axe R-C du corps humain et servir de support pour étudier les pathologies neuromusculaires tel que la SMA ou la maladie de Steinert.

## 2. [Etudes dans un cadre pathologiques/thérapeutiques](#)

Mes travaux donnent pour la première fois accès à un ensemble de sous-types de MNs humains qui peuvent être utilisés pour étudier les bases des maladies affectant les MNs. Ce modèle de génération de MNs humains dérivés de CSPh pourra aussi être utilisé pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de traiter ces maladies.

### a) [Modélisation de pathologies affectant les motoneurones](#)

Les maladies affectant les MNs sont le 3ème groupe de maladies neurodégénératives après la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. La forme principale d'amyotrophie spinale (SMA) est due à une mutation sur le gène de survie des MNs *SMN1*. Des essais cliniques récents permettant de restaurer les niveaux de protéine SMN par thérapie génique redonnent espoir pour le traitement de cette maladie (Finkel et al., 2017; Mendell et al., 2017). Cependant, les formes plus rares de SMA provoquant notamment une atrophie des membres inférieurs (SMALED pour Spinal muscular atrophy with lower extremity dominance) ne connaissent pas de traitement à l'heure actuelle autre que palliatif (Souza et al., 2018). De façon intéressante, différents sous-types de MNs présents le long de l'axe R-C sont inégalement affectés par ces pathologies (Kanning et al., 2010; Mentis et al., 2011). L'origine de cette différence de sensibilité des MNs reste méconnue à l'heure actuelle. Cette méconnaissance est due en partie à l'accès limité aux MNs humains ainsi qu'à des protocoles adaptés pour générer les différents sous-types de MNs le long de l'axe R-C. Le protocole développé dans notre équipe a déjà été utilisé par plusieurs laboratoires de recherche pour des études pathologiques (Guo et al., 2017; Sances et al., 2016). À partir de mes travaux, qui permettent pour la première fois l'accès à MNs plus caudaux il sera intéressant d'étudier les bases de la différence de vulnérabilité entre les populations de MNs pour comprendre ce qui les protègent ou conduit à leur dégénération par exemple par analyse comparative des sous-types MNs en condition saine ou pathologique par séquençage de l'ARN unicellulaire (Grün and van Oudenaarden, 2015).

b) [Utilisation des MNs pour le criblage](#)

Comme il a déjà été fait dans des études précédentes, les MNs humains *in vitro* peuvent servir de support pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (Burkhardt et al., 2013; Sun et al., 2018). Dans le cadre des travaux, les sous-types de MNs différenciés à partir de CSPh mutées pourraient être utilisés pour réaliser des études criblages, en se basant sur des biomarqueurs significativement altérés dans le contexte pathologique. Ces biomarqueurs peuvent être soit déjà identifiés, soit spécifiquement détectés dans des sous-types de MNs. Ces études permettraient d'identifier des molécules candidates pour le traitement des différentes pathologies affectant les sous-types de MNs.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi, 2007. Human GLI3 intragenic conserved non-coding sequences are tissue-specific enhancers. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426814>
- Aires, R., de Lemos, L., Nóvoa, A., Jurberg, A.D., Mascrez, B., Duboule, D., Mallo, M., 2019. Tail Bud Progenitor Activity Relies on a Network Comprising Gdf11, Lin28, and Hox13 Genes. *Developmental Cell*.
- Akai, J., 2005. FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone. *Genes & Development* 19, 2877–2887.
- Aldskogius, H., Berens, C., Kanaykina, N., Liakhovitskaia, A., Medvinsky, A., Sandelin, M., Schreiner, S., Wegner, M., Hjerling-Leffler, J., Kozlova, E.N., 2009. Regulation of Boundary Cap Neural Crest Stem Cell Differentiation After Transplantation. *Stem Cells* 27, 1592–1603.
- Altman, J., Bayer, S., 2001. *Development of the human spinal cord: an interpretation based on experimental studies in animals*. CRC press, Oxford.
- Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S., Martí, E., 2008. Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* 135, 237–247.
- Amin, S., Neijts, R., Simmini, S., van Rooijen, C., Tan, S.C., Kester, L., van Oudenaarden, A., Creighton, M.P., Deschamps, J., 2016. Cdx and T Brachyury Co-activate Growth Signaling in the Embryonic Axial Progenitor Niche. *Cell Rep* 17, 3165–3177.
- Amoroso, M.W., Croft, G.F., Williams, D.J., O’Keeffe, S., Carrasco, M.A., Davis, A.R., Roybon, L., Oakley, D.H., Maniatis, T., Henderson, C.E., Wichterle, H., 2013. Accelerated High-Yield Generation of Limb-Innervating Motor Neurons from Human Stem Cells. *Journal of Neuroscience* 33, 574–586.
- Andrews, M.G., del Castillo, L.M., Ochoa-Bolton, E., Yamauchi, K., Smogorzewski, J., Butler, S.J., 2017. BMPs direct sensory interneuron identity in the developing spinal cord using signal-specific not morphogenic activities. *eLife* 6, e30647.
- Andrews, M.G., Kong, J., Novitsch, B.G., Butler, S.J., 2019. New perspectives on the mechanisms establishing the dorsal-ventral axis of the spinal cord, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 417–450.
- Baek, M., Pivetta, C., Liu, J.-P., Arber, S., Dasen, J.S., 2017. Columnar-Intrinsic Cues Shape Premotor Input Specificity in Locomotor Circuits. *Cell Reports* 21, 867–877.
- Barrow, J.R., Howell, W.D., Rule, M., Hayashi, S., Thomas, K.R., Capocchi, M.R., McMahon, A.P., 2007. Wnt3 signaling in the epiblast is required for proper orientation of the anteroposterior axis. *Developmental Biology* 312, 312–320.
- Bayer, S., Altman, J., 2002. *Atlas of human central nervous system development*. CRC press, Boca Raton.
- Beccari, L., Moris, N., Girgin, M., Turner, D.A., Baillie-Johnson, P., Cossy, A.-C., Lutolf, M.P., Duboule, D., Arias, A.M., 2018. Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids. *Nature* 562, 272–276.
- Belting, H.G., Shashikant, C.S., Ruddle, F.H., 1998. Multiple phases of expression and regulation of mouse Hoxc8 during early embryogenesis. *Journal of Experimental Zoology*.
- Bel-Vialar, S., Itasaki, N., Krumlauf, R., 2002. Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development* 129, 5103–5115.
- Bel-Vialar, S., Medevielle, F., Pituello, F., 2007. The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord. *Developmental Biology* 305, 659–673.
- Bénazéraf, B., Francois, P., Baker, R.E., Denans, N., Little, C.D., Pourquié, O., 2010. A random cell motility gradient downstream of FGF controls elongation of an amniote embryo. *Nature* 466, 248–252.

- Ben-Yehudah, A., Malcov, M., Frumkin, T., Ben-Yosef, D., 2012. Mutated human embryonic stem cells for the study of human genetic disorders. *Methods Mol. Biol.* 873, 179–207.
- Bergin, A., Kim, G., Price, D.L., Sisodia, S.S., Lee, M.K., Rabin, B.A., 1997. Identification and characterization of a mouse homologue of the spinal muscular atrophy-determining gene, survival motor neuron. *Gene* 204, 47–53.
- Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517–530.
- Bertrand, N., Médevielle, F., Pituello, F., 2000. FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development* 127, 4837–4843.
- Boulet, A.M., Capecchi, M.R., 2012. Signaling by FGF4 and FGF8 is required for axial elongation of the mouse embryo. *Developmental Biology* 371, 235–245.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T.M., Struhl, G., 2001. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol. Cell* 7, 1279–1291.
- Briscoe, J., Novitsch, B.G., 2008. Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 57–70.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., Ericson, J., 2000. A Homeodomain Protein Code Specifies Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in the Ventral Neural Tube. *Cell* 101, 435–445.
- Brown, J.M., Storey, K.G., 2000. A region of the vertebrate neural plate in which neighbouring cells can adopt neural or epidermal fates. *Curr. Biol.* 10, 869–872.
- Bueker, E.D., 1944. DIFFERENTIATION OF THE LATERAL MOTOR COLUMN IN THE AVIAN SPINAL CORD. *Science* 100, 169.
- Burghes, A.H.M., Beattie, C.E., 2009. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 597–609.
- Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., Tabin, C., 1995. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology 14.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P., Zajac, F.E., 1973. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol. (Lond.)* 234, 723–748. 9
- Burkhardt, M.F., Martinez, F.J., Wright, S., Ramos, C., Volfson, D., Mason, M., Garnes, J., Dang, V., Lievers, J., Shoukat-Mumtaz, U., Martinez, R., Gai, H., Blake, R., Vaisberg, E., Grskovic, M., Johnson, C., Irion, S., Bright, J., Cooper, B., Nguyen, L., Griswold-Prenner, I., Javaherian, A., 2013. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci* 56, 355–364.
- Cambray, N., Wilson, V., 2007. Two distinct sources for a population of maturing axial progenitors. *Development* 134, 2829–2840.
- Cambray, N., Wilson, V., 2002. Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge. *Development* 129, 4855–4866.
- Carapuço, M., Nóvoa, A., Bobola, N., Mallo, M., 2005. Hox genes specify vertebral types in the presomitic mesoderm. *Genes Dev* 19, 2116–2121. <https://doi.org/10.1101/gad.338705>
- Carpenter, E.M., 2002. *Hox Genes and Spinal Cord Development*. *Dev Neurosci* 24, 24–34. <https://doi.org/10.1159/000064943>
- Catela, C., Shin, M.M., Lee, D.H., Liu, J.-P., Dasen, J.S., 2016. Hox Proteins Coordinate Motor Neuron Differentiation and Connectivity Programs Through Ret/Gfrα Genes. *Cell Rep* 14, 1901–1915. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.067>
- Chaimowicz, C., Ruffault, P.-L., Chéret, C., Woehler, A., Zampieri, N., Fortin, G., Garratt, A.N., Birchmeier, C., 2019. Teashirt 1 (Tshz1) is essential for the development, survival and function of hypoglossal and phrenic motor neurons in mouse. *Development* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.174045>
- Chalamalasetty, R.B., Garriock, R.J., Dunty, W.C., Kennedy, M.W., Jailwala, P., Si, H., Yamaguchi, T.P., 2014. Mesogenin 1 is a master regulator of paraxial presomitic mesoderm differentiation. *Development* 141, 4285–4297.

- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., Studer, L., 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275–280.
- Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., 1998. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. *Nature* 391, 695–697.
- Charrier, J.B., Teillet, M.A., Lapointe, F., Le Douarin, N.M., 1999. Defining subregions of Hensen's node essential for caudalward movement, midline development and cell survival. *Development* 126, 4771–4783.
- Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V.E., Köntgen, F., Beck, F., 1997. Homeosis and intestinal tumours in *Cdx2* mutant mice. *Nature* 386, 84–87.
- Chen, H.-H., Hippenmeyer, S., Arber, S., Frank, E., 2003. Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. *Current Opinion in Neurobiology* 13, 96–102.
- Chesnutt, C., Burrus, L.W., Brown, A.M.C., Niswander, L., 2004. Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGFbeta and WNT activity. *Dev. Biol.* 274, 334–347.
- Chiang, 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. - PubMed - NCBI [WWW Document]. PMID : 8837770
- Churko, J.M., Burridge, P.W., Wu, J.C., 2013. Generation of Human iPSCs from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Non-integrative Sendai Virus in Chemically Defined Conditions, in: Kao, R.L. (Ed.), *Cellular Cardiomyoplasty*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 81–88.
- Ciruna, B., Rossant, J., 2001. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev. Cell* 1, 37–49.
- Clowry, G.J., Moss, J.A., Clough, R.L., 2005. An immunohistochemical study of the development of sensorimotor components of the early fetal human spinal cord. *J. Anat.* 207, 313–324.
- Cohen, S., Funkelstein, L., Livet, J., Rougon, G., Henderson, C.E., Castellani, V., Mann, F., 2005. A semaphorin code defines subpopulations of spinal motor neurons during mouse development. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1767–1776.
- Cunningham, T.J., Kumar, S., Yamaguchi, T.P., Duester, G., 2015. *Wnt8a* and *Wnt3a* cooperate in the axial stem cell niche to promote mammalian body axis extension. *Developmental Dynamics* 244, 797–807.
- da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y.H., Ahmado, A., Vernon, A., Daniels, J.T., Nommiste, B., Hasan, S.M., Gooljar, S.B., Carr, A.-J.F., Vugler, A., Ramsden, C.M., Bictash, M., Fenster, M., Steer, J., Harbinson, T., Wilbrey, A., Tufail, A., Feng, G., Whitlock, M., Robson, A.G., Holder, G.E., Sagoo, M.S., Loudon, P.T., Whiting, P., Coffey, P.J., 2018. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat. Biotechnol.* 36, 328–337.
- Dalla Torre di Sanguinetto, S.A., Dasen, J.S., Arber, S., 2008. Transcriptional mechanisms controlling motor neuron diversity and connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 36–43.
- Dasen, J.S., 2009. Chapter 4 Transcriptional Networks in the Early Development of Sensory-Motor Circuits, 1st ed, *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier Inc.
- Dasen, J.S., De Camilli, A., Wang, B., Tucker, P.W., Jessell, T.M., 2008. Hox Repertoires for Motor Neuron Diversity and Connectivity Gated by a Single Accessory Factor, *FoxP1*. *Cell* 134, 304–316.
- Dasen, J.S., Jessell, T.M., 2009. Chapter Six Hox Networks and the Origins of Motor Neuron Diversity, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 169–200.
- Dasen, J.S., Liu, J.-P., Jessell, T.M., 2003. Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of *Hox-c* activity. *Nature* 425, 926–933.
- Dasen, J.S., Tice, B.C., Brenner-Morton, S., Jessell, T.M., 2005. A Hox Regulatory Network Establishes Motor Neuron Pool Identity and Target-Muscle Connectivity. *Cell* 123, 477–491.
- Davis-Dusenbery, B.N., Williams, L.A., Klim, J.R., Eggen, K., 2014. How to make spinal motor neurons. *Development* 141, 491–501.

- de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., Conlon, R.A., 1997. Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124, 1139–1148.
- De Marco Garcia, N.V., Jessell, T.M., 2008. Early motor neuron pool identity and muscle nerve trajectory defined by postmitotic restrictions in Nkx6.1 activity. *Neuron* 57, 217–231.
- del Álamo, D., Rouault, H., Schweisguth, F., 2011. Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. *Curr. Biol.* 21, R40-47.
- del Corral, R.D., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., Storey, K., 2003. Opposing FGF and Retinoid Pathways Control Ventral Neural Pattern, Neuronal Differentiation, and Segmentation during Body Axis Extension. *Neuron* 40, 65–79.
- del Corral, R.D., Storey, K.G., 2004. Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 26, 857–869.
- Delfino-Machín, M., Lunn, J.S., Breitzkreuz, D.N., Akai, J., Storey, K.G., 2005. Specification and maintenance of the spinal cord stem zone. *Development* 132, 4273–4283.
- Denans, N., Imura, T., Pourquie, O., 2015. Hox genes control vertebrate body elongation by collinear Wnt repression. *eLife* 4, e04379. <https://doi.org/10.7554/eLife.04379>
- Denham, M., Hasegawa, K., Menhenniott, T., Rollo, B., Zhang, D., Hough, S., Alshawaf, A., Febbraro, F., Ighaniyan, S., Leung, J., Elliott, D.A., Newgreen, D.F., Pera, M.F., Dottori, M., 2015. Multipotent caudal neural progenitors derived from human pluripotent stem cells that give rise to lineages of the central and peripheral nervous system. *Stem Cells* 33, 1759–1770.
- Deschamps, J., Duboule, D., 2017. Embryonic timing, axial stem cells, chromatin dynamics, and the Hox clock. *Genes and Development* 31, 1406–1416.
- Deschamps, J., Wijgerde, M., 1993. Two phases in the establishment of HOX expression domains. *Dev. Biol.* 156, 473–480.
- Dessaud, E., Ribes, V., Balaskas, N., Yang, L.L., Pierani, A., Kicheva, A., Novitsch, B.G., Briscoe, J., Sasai, N., 2010. Dynamic Assignment and Maintenance of Positional Identity in the Ventral Neural Tube by the Morphogen Sonic Hedgehog. *PLoS Biol* 8, e1000382.
- Dessaud, E., Yang, L.L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitsch, B.G., Briscoe, J., 2007. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450, 717–720.
- Di Giorgio, F.P., Boulting, G.L., Bobrowicz, S., Eggan, K.C., 2008. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 3, 637–648.
- Dietz, V., 2002. Proprioception and locomotor disorders. *Nat Rev Neurosci* 3, 781–790.
- Diez del Corral, R., Breitzkreuz, D.N., Storey, K.G., 2002. Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signalling. *Development* 129, 1681–1691.
- Dillon, A.K., 2005. Molecular Control of Spinal Accessory Motor Neuron/Axon Development in the Mouse Spinal Cord. *Journal of Neuroscience* 25, 10119–10130.
- du Plessis, A.J., Volpe, J.J., 2018. Neural Tube Development, in: Volpe's Neurology of the Newborn. Elsevier, pp. 3-33.e8.
- Du, Z.-W., Chen, H., Liu, H., Lu, J., Qian, K., Huang, C.-L., Zhong, X., Fan, F., Zhang, S.-C., 2015. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 6, 6626.
- Duboule, D., Dollé, P., 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J.* 8, 1497–1505.
- Dunty, W.C., Biris, K.K., Chalamalasetty, R.B., Taketo, M.M., Lewandoski, M., Yamaguchi, T.P., 2008. Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation. *Development* 135, 85–94.
- Dunwoodie, S.L., Clements, M., Sparrow, D.B., Sa, X., Conlon, R.A., Beddington, R.S.P., 2002. Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene *Dll3* are

- associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development* 129, 1795–1806.
- Duval, N., Vaslin, C., Barata, T.C., Frarma, Y., Contremoulins, V., Baudin, X., Nedelec, S., Ribes, V.C., 2019. BMP4 patterns Smad activity and generates stereotyped cell fate organization in spinal organoids. *Development*.
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N., 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277–280.
- Ebisuya, M., Briscoe, J., 2018. What does time mean in development? *Development (Cambridge)*.
- Eccles, J.C., Eccles, R.M., Lundberg, A., 1957. The convergence of monosynaptic excitatory afferents on to many different species of alpha motoneurons. *The Journal of Physiology* 137, 22–50.
- Edri, S., Hayward, P., Jawaid, W., Martinez Arias, A., 2019. Neuro-mesodermal progenitors (NMPs): a comparative study between pluripotent stem cells and embryo-derived populations. *Development (Cambridge, England)*.
- Eggert, C., Chari, A., Lagerbauer, B., Fischer, U., 2006. Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol Med* 12, 113–121.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., Ben-Yosef, D., 2007. Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568–577.
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., Sasai, Y., 2008. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* 3, 519–532.
- Ensign, M., Tsuchida, T.N., Belting, H.-G., Jessell, T.M., 1998. The control of rostrocaudal pattern in the developing spinal cord: specification of motor neuron subtype identity is initiated by signals from paraxial mesoderm 14.
- Erb, M., Lee, B., Yeon Seo, S., Lee, J.W., Lee, S., Lee, S.-K., 2017. The Isl1-Lhx3 Complex Promotes Motor Neuron Specification by Activating Transcriptional Pathways that Enhance Its Own Expression and Formation. *eNeuro* 4.
- Ericson, J., Briscoe, J., VAN HEYNING, V., Jessell, T.M., 1997. Graded Sonic Hedgehog Signaling and the Specification of Cell Fate in the Ventral Neural Tube. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 62, 451–466.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., Jessell, T.M., 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661–673.
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T.M., Yamada, T., 1992. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256, 1555–1560.
- Espinosa-Medina, I., Saha, O., Boismoreau, F., Brunet, J.-F., 2018. The “sacral parasympathetic”: ontogeny and anatomy of a myth. *Clin. Auton. Res.* 28, 13–21.
- Espinosa-Medina, I., Saha, O., Boismoreau, F., Chettouh, Z., Rossi, F., Richardson, W.D., Brunet, J.-F., 2016. The sacral autonomic outflow is sympathetic. *Science* 354, 893–897.
- Evans, A.L., Faial, T., Gilchrist, M.J., Down, T., Vallier, L., Pedersen, R.A., Wardle, F.C., Smith, J.C., 2012. Genomic targets of Brachyury (T) in differentiating mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* 7, e33346.
- Evrard, Y.A., Lun, Y., Aulehla, A., Gan, L., Johnson, R.L., 1998. Lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning. *Nature* 394, 377–381.
- Evtouchenko, L., Studer, L., Spencer, C., Dreher, E., Seiler, R.W., 1996. A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. *Cell Transplantation*.
- Faravelli, I., Bucchia, M., Rinchetti, P., Nizzardo, M., Simone, C., Frattini, E., Corti, S., 2014. Motor neuron derivation from human embryonic and induced pluripotent stem cells: experimental approaches and clinical perspectives. *Stem Cell Res Ther* 5, 87.
- Finkel, R.S., Mercuri, E., Darras, B.T., Connolly, A.M., Kuntz, N.L., Kirschner, J., Chiriboga, C.A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E., Topaloglu, H., Tulinius, M., Montes, J., Glanzman, A.M., Bishop, K., Zhong, Z.J., Gheuens, S., Bennett, C.F., Schneider, E., Farwell, W., De Vivo, D.C., 2017.

- Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy [WWW Document].
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., Glass, J.D., 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* 185, 232–240.
- Forlani, S., Lawson, K.A., Deschamps, J., 2003. Acquisition of Hox codes during gastrulation and axial elongation in the mouse embryo. *Development* 130, 3807–3819.
- Frank, E., Mendelson, B., 1990. Specification of synaptic connections between sensory and motor neurons in the developing spinal cord. *J. Neurobiol.* 21, 33–50.
- Friese, A., Kaltschmidt, J.A., Ladle, D.R., Sigrist, M., Jessell, T.M., Arber, S., 2009. Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor *Err3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13588–13593.
- Frith, T.J.R., Granata, I., Wind, M., Stout, E., Thompson, O., Neumann, K., Stavish, D., Heath, P.R., Ortman, D., Hackland, J.O.S., Anastassiadis, K., Gouti, M., Briscoe, J., Wilson, V., Johnson, S.L., Placzek, M., Guarracino, M.R., Andrews, P.W., Tsakiridis, A., 2018. Human axial progenitors generate trunk neural crest cells in vitro. *eLife*.
- Gabanella, F., Carissimi, C., Usiello, A., Pellizzoni, L., 2005. The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3629–3642.
- Gamer, L.W., Wolfman, N.M., Celeste, A.J., Hattersley, G., Hewick, R., Rosen, V., 1999. A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 208, 222–232.
- Gamer, L.W., Wright, C.V., 1993. Murine *Cdx-4* bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech. Dev.* 43, 71–81.
- Garriock, R.J., Chalamalasetty, R.B., Kennedy, M.W., Canizales, L.C., Lewandoski, M., Yamaguchi, T.P., 2015. Lineage tracing of neuromesodermal progenitors reveals novel Wnt-dependent roles in trunk progenitor cell maintenance and differentiation. *Development* 142, 1628–1638.
- Gaspard, N., Bouschet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., Van Den Aemele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., Gaillard, A., Vanderhaeghen, P., 2008. An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455, 351–357.
- Gaunt, S.J., 1988. Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of *Hox-3.1* and *Hox-1.5*. *Development* 103, 135–144.
- Gaunt, S.J., George, M., Paul, Y.L., 2013. Direct activation of a mouse *Hoxd11* axial expression enhancer by *Gdf11*/*Smad* signalling. *Developmental Biology* 383, 52–60.
- Gaunt, S.J., Krumlauf, R., Duboule, D., 1989. Mouse homeo-genes within a subfamily, *Hox-1.4*, *-2.6* and *-5.1*, display similar anteroposterior domains of expression in the embryo, but show stage- and tissue-dependent differences in their regulation. *Development* 107, 131–141.
- Gaunt, S.J., Strachan, L., 1996. Temporal colinearity in expression of anterior hox genes in developing chick embryos. *Developmental Dynamics* 207, 270–280.
- Gibson, G., Gehring, W.J., 1988. Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of *Antennapedia* during *Drosophila* development. *Development* 19.
- Golias, C.H., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K., 2004. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International Journal of Clinical Practice* 58, 1134–1141.
- Gomez, C., Ozbudak, E.M., Wunderlich, J., Baumann, D., Lewis, J., Pourquié, O., 2008. Control of segment number in vertebrate embryos. *Nature* 454, 335–339.
- Goparaju, S.K., Kohda, K., Ibata, K., Soma, A., Nakatake, Y., Akiyama, T., Wakabayashi, S., Matsushita, M., Sakota, M., Kimura, H., Yuzaki, M., Ko, S.B.H., Ko, M.S.H., 2017. Rapid differentiation of human pluripotent stem cells into functional neurons by mRNAs encoding transcription factors. *Sci Rep* 7, 42367.

- Goto, K., Imamura, K., Komatsu, K., Mitani, K., Aiba, K., Nakatsuji, N., Inoue, M., Kawata, A., Yamashita, H., Takahashi, R., Inoue, H., 2017. Simple Derivation of Spinal Motor Neurons from ESCs/iPSCs Using Sendai Virus Vectors. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 4, 115–125.
- Gouti, M., Delile, J., Stamataki, D., Wymeersch, F.J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V., Briscoe, J., 2017. A Gene Regulatory Network Balances Neural and Mesoderm Specification during Vertebrate Trunk Development. *Developmental Cell* 41, 243–261.e7.
- Gouti, M., Metzis, V., Briscoe, J., 2015. The route to spinal cord cell types: a tale of signals and switches. *Trends in Genetics* 31, 282–289.
- Gouti, M., Tsakiridis, A., Wymeersch, F.J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V., Briscoe, J., 2014. In Vitro Generation of Neuromesodermal Progenitors Reveals Distinct Roles for Wnt Signalling in the Specification of Spinal Cord and Paraxial Mesoderm Identity. *PLoS Biol* 12, e1001937.
- Graba, Y., Aragnol, D., Pradel, J., 1997. Drosophila Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *Bioessays* 19, 379–388.
- Grün, D., van Oudenaarden, A., 2015. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell* 163, 799–810.
- Guo, W., Naujock, M., Fumagalli, L., Vandoorne, T., Baatsen, P., Boon, R., Ordoñas, L., Patel, A., Welters, M., Vanwelden, T., Geens, N., Tricot, T., Benoy, V., Steyaert, J., Lefebvre-Omar, C., Boesmans, W., Jarpe, M., Sternecker, J., Wegner, F., Petri, S., Bohl, D., Vanden Berghe, P., Robberecht, W., Van Damme, P., Verfaillie, C., Van Den Bosch, L., 2017. HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nat Commun* 8.
- Gurdon, J.B., 1962. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.* 4, 256–273.
- Gutman, C.R., Ajmera, M.K., Hollyday, M., 1993. Organization of motor pools supplying axial muscles in the chicken. *Brain Research* 609, 129–136.
- Haase, G., Dessaud, E., Garcès, A., de Bovis, B., Birling, M., Filippi, P., Schmalbruch, H., Arber, S., deLapeyrière, O., 2002. GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron* 35, 893–905.
- Hagan, D.M., Ross, A.J., Strachan, T., Lynch, S.A., Ruiz-Perez, V., Wang, Y.M., Scambler, P., Custard, E., Reardon, W., Hassan, S., Nixon, P., Papapetrou, C., Winter, R.M., Edwards, Y., Morrison, K., Barrow, M., Cordier-Alex, M.P., Correia, P., Galvin-Parton, P.A., Gaskill, S., Gaskin, K.J., Garcia-Minaur, S., Gereige, R., Hayward, R., Homfray, T., 2000. Mutation analysis and embryonic expression of the HLXB9 Currarino syndrome gene. *Am J Hum Genet* 66, 1504–1515.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn.* 195, 231–272.
- Harper, J.M., Krishnan, C., Darman, J.S., Deshpande, D.M., Peck, S., Shats, I., Backovic, S., Rothstein, J.D., Kerr, D.A., 2004. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 7123–7128.
- Hegedus, J., Putman, C.T., Gordon, T., 2007. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 28, 154–164.
- Henrique, D., Abranches, E., Verrier, L., Storey, K.G., 2015. Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord. *Development* 142, 2864–2875.
- Hollyday, M., 1980. Organization of motor pools in the chick lumbar lateral motor column. *J. Comp. Neurol.* 194, 143–170.
- Hollyday, M., Jacobson, R.D., 1990. Location of motor pools innervating chick wing. *J. Comp. Neurol.* 302, 575–588.
- Holowacz, T., Sokol, S., 1999. FGF Is Required for Posterior Neural Patterning but Not for Neural Induction. *Developmental Biology* 205, 296–308. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9108>
- Honig, M.G., Lance-Jones, C., Landmesser, L., 1986. The development of sensory projection patterns in embryonic chick hindlimb under experimental conditions. *Developmental Biology* 118, 532–548.
- Horan, G.S., Ramírez-Solis, R., Featherstone, M.S., Wolgemuth, D.J., Bradley, A., Behringer, R.R., 1995. Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more

- complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev.* 9, 1667–1677.
- Hu, B.-Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J.A., Zhang, S.-C., 2010. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4335–4340.
- Hu, B.-Y., Zhang, S.-C., 2009. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* 4, 1295–1304.
- Hughes, B.W., Kusner, L.L., Kaminski, H.J., 2006. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 33, 445–461.
- Ikeya, M., Takada, S., 2001. Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mechanisms of Development* 103, 27–33.
- Itsykson, P., Ilouz, N., Turetsky, T., Goldstein, R.S., Pera, M.F., Fishbein, I., Segal, M., Reubinoff, B.E., 2005. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Molecular and Cellular Neuroscience* 30, 24–36.
- Iulianella, A., Beckett, B., Petkovich, M., Lohnes, D., 1999. A molecular basis for retinoic acid-induced axial truncation. *Dev. Biol.* 205, 33–48.
- Jaw, T.J., You, L.R., Knoepfler, P.S., Yao, L.C., Pai, C.Y., Tang, C.Y., Chang, L.P., Berthelsen, J., Blasi, F., Kamps, M.P., Sun, Y.H., 2000. Direct interaction of two homeoproteins, homothorax and extradenticle, is essential for EXD nuclear localization and function. *Mech. Dev.* 91, 279–291.
- Jegalian, B.G., De Robertis, E.M., 1992. Homeotic transformations in the mouse induced by overexpression of a human *Hox3.3* transgene. *Cell* 71, 901–910.
- Jessell, T.M., 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1, 20–29.
- Juan, A.H., Ruddle, F.H., 2003. Enhancer timing of Hox gene expression: Deletion of the endogenous *Hoxc8* early enhancer. *Development*.
- Jung, H., Lacombe, J., Mazzoni, E.O., Liem, K.F., Grinstein, J., Mahony, S., Mukhopadhyay, D., Gifford, D.K., Young, R.A., Anderson, K.V., Wichterle, H., Dasen, J.S., 2010. Global Control of Motor Neuron Topography Mediated by the Repressive Actions of a Single Hox Gene. *Neuron* 67, 781–796.
- Jung, H., Mazzoni, E.O., Soshnikova, N., Hanley, O., Venkatesh, B., Duboule, D., Dasen, J.S., 2014. Evolving Hox Activity Profiles Govern Diversity in Locomotor Systems. *Developmental Cell* 29, 171–187.
- Kanning, K.C., Kaplan, A., Henderson, C.E., 2010. Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 409–440.
- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J.K., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka, S., Osafune, K., 2019. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol. Rev.* 99, 79–114.
- Kmita, M., Duboule, D., 2003. Organizing Axes in Time and Space; 25 Years of Colinear Tinkering. *Science* 301, 331–333.
- Kobayashi, N., Homma, S., Okada, T., Masuda, T., Sato, N., Nishiyama, K., Sakuma, C., Shimada, T., Yaginuma, H., 2013. Elucidation of target muscle and detailed development of dorsal motor neurons in chick embryo spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 521, 2987–3002.
- Koch, F., Scholze, M., Wittler, L., Schifferl, D., Sudheer, S., Grote, P., Timmermann, B., Macura, K., Herrmann, B.G., 2017. Antagonistic Activities of Sox2 and Brachyury Control the Fate Choice of Neuro-Mesodermal Progenitors. *Developmental Cell* 42, 514-526.e7.
- Kohwi, M., Doe, C.Q., 2013. Temporal fate specification and neural progenitor competence during development. *Nature Reviews Neuroscience* 14, 823–838.
- Kondoh, H., Takemoto, T., 2012. Axial stem cells deriving both posterior neural and mesodermal tissues during gastrulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 374–380.
- Krumlauf, R., 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191–201.

- Kumar, R., DiMenna, L., Schrode, N., Liu, T.-C., Franck, P., Muñoz-Descalzo, S., Hadjantonakis, A.-K., Zarrin, A.A., Chaudhuri, J., Elemento, O., Evans, T., 2013. AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature* 500, 89–92.
- Kumar, S., Duester, G., 2014. Retinoic acid controls body axis extension by directly repressing *Fgf8* transcription. *Development* 141, 2972–2977.
- Lacombe, J., Hanley, O., Jung, H., Philippidou, P., Surmeli, G., Grinstein, J., Dasen, J.S., 2013. Genetic and Functional Modularity of Hox Activities in the Specification of Limb-Innervating Motor Neurons. *PLoS Genet* 9, e1003184.
- 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.
- Ladam, F., Sagerström, C.G., 2014. Functional analysis of hox genes in zebrafish. *Methods Mol. Biol.* 1196, 133–144.
- Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Donnadieu, A.C., Frydman, R., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2006. Use of organ culture to study the human fetal testis development: Effect of retinoic acid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2113>
- Lance-Jones, C., Landmesser, L., 1980. Motoneuron projection patterns in the chick hind limb following early partial reversals of the spinal cord. *The Journal of Physiology* 302, 581–602.
- Landmesser, L., 1978a. The development of motor projection patterns in the chick hind limb. *J. Physiol. (Lond.)* 284, 391–414.
- Landmesser, L., 1978b. The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. *J. Physiol. (Lond.)* 284, 371–389.
- Landmesser, L., Honig, M.G., 1986. Altered sensory projections in the chick hind limb following the early removal of motoneurons. *Developmental Biology* 118, 511–531.
- Landmesser, L.T., 2001. The acquisition of motoneuron subtype identity and motor circuit formation. *International Journal of Developmental Neuroscience* 19, 175–182.
- LaRonde-LeBlanc, N.A., Wolberger, C., 2003. Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev.* 17, 2060–2072.
- Lee, K.J., Dietrich, P., Jessell, T.M., 2000. Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403, 734–740. <https://doi.org/10.1038/35001507>
- Lee, S.-K., Lee, B., Ruiz, E.C., Pfaff, S.L., 2005. Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes Dev* 19, 282–294.
- Lee, S.K., Pfaff, S.L., 2003. Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* 38, 731–745.
- Lee, Y.J., McPherron, A., Choe, S., Sakai, Y., Chandraratna, R.A., Lee, S.-J., Oh, S.P., 2010. Growth differentiation factor 11 signaling controls retinoic acid activity for axial vertebral development. *Dev Biol* 347, 195–203.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., Perrier, A.L., 2008. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* 26, 1364–1366.
- Levine, A.J., Brivanlou, A.H., 2007. Proposal of a model of mammalian neural induction. *Developmental Biology* 308, 247–256.
- Lewis, E.B., 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
- Li, C.-J., Hong, T., Tung, Y.-T., Yen, Y.-P., Hsu, H.-C., Lu, Y.-L., Chang, M., Nie, Q., Chen, J.-A., 2017. MicroRNA filters Hox temporal transcription noise to confer boundary formation in the spinal cord. *Nat Commun* 8, 14685.
- Li, X.-J., Du, Z.-W., Zarnowska, E.D., Pankratz, M., Hansen, L.O., Pearce, R.A., Zhang, S.-C., 2005. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 215–221.
- Li, X.-J., Hu, B.-Y., Jones, S.A., Zhang, Y.-S., LaVaute, T., Du, Z.-W., Zhang, S.-C., 2008. Directed Differentiation of Ventral Spinal Progenitors and Motor Neurons from Human Embryonic Stem Cells by Small Molecules. *Stem Cells* 26, 886–893.

- Liem, K.F., Tremml, G., Jessell, T.M., 1997. A Role for the Roof Plate and Its Resident TGF $\beta$ -Related Proteins in Neuronal Patterning in the Dorsal Spinal Cord. *Cell* 91, 127–138.
- Lin, J.H., Saito, T., Anderson, D.J., Lance-Jones, C., Jessell, T.M., Arber, S., 1998. Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell* 95, 393–407.
- Lippmann, E.S., Williams, C.E., Ruhl, D.A., Estevez-Silva, M.C., Chapman, E.R., Coon, J.J., Ashton, R.S., 2015. Deterministic HOX Patterning in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neuroectoderm. *Stem Cell Reports* 4, 632–644.
- Litingtung, Y., Chiang, C., 2000. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat. Neurosci.* 3, 979–985.
- Liu, J.-P., 2006. The function of growth/differentiation factor 11 (Gdf11) in rostrocaudal patterning of the developing spinal cord. *Development* 133, 2865–2874.
- Liu, J.P., Laufer, E., Jessell, T.M., 2001. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* 32, 997–1012.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., Bradley, A., 1999. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat. Genet.* 22, 361–365.
- Liu, Q., Fischer, U., Wang, F., Dreyfuss, G., 1997. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90, 1013–1021.
- Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S.R., Henderson, C.E., Jessell, T.M., Arber, S., 2002. ETS Gene Pea3 Controls the Central Position and Terminal Arborization of Specific Motor Neuron Pools. *Neuron* 35, 877–892.
- Lohnes, D., 2003. The Cdx1 homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *Bioessays* 25, 971–980.
- Lund, R.J., NÄrvä, E., Lahesmaa, R., 2012. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Genet.* 13, 732–744.
- Lunn, J.S., Fishwick, K.J., Halley, P.A., Storey, K.G., 2007. A spatial and temporal map of FGF/Erk1/2 activity and response repertoires in the early chick embryo. *Developmental Biology* 302, 536–552.
- Machado, C.B., Kanning, K.C., Kreis, P., Stevenson, D., Crossley, M., Nowak, M., Iacovino, M., Kyba, M., Chambers, D., Blanc, E., Lieberam, I., 2014. Reconstruction of phrenic neuron identity in embryonic stem cell-derived motor neurons. *Development* 141, 784–794.
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., Zile, M., 1996. Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Current Biology* 6, 417–426.
- Mahony, S., Mazzoni, E.O., McCuine, S., Young, R.A., Wichterle, H., Gifford, D.K., 2011. Ligand-dependent dynamics of retinoic acid receptor binding during early neurogenesis. *Genome Biol.* 12, R2.
- Mai, J., Paxinos, G., 2011. The human nervous system.
- Mallo, M., Vinagre, T., Carapuo, M., 2009. The road to the vertebral formula. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1469–1481.
- Mann, R.S., 1995. The specificity of homeotic gene function. *Bioessays* 17, 855–863.
- Mann, R.S., Chan, S.K., 1996. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet.* 12, 258–262.
- Mann, R.S., Lelli, K.M., Joshi, R., 2009. Hox Specificity: Unique Roles for Cofactors and Collaborators. *Curr Top Dev Biol* 88, 63–101.
- Marklund, U., Alekseenko, Z., Andersson, E., Falci, S., Westgren, M., Perlmann, T., Graham, A., Sundström, E., Ericson, J., 2014. Detailed Expression Analysis of Regulatory Genes in the Early Developing Human Neural Tube. *Stem Cells and Development* 23, 5–15.
- Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M.M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J.A., Pietu, G., Peschanski, M., Martinat, C., 2011. Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell* 8, 434–444.

- Martí, E., Takada, R., Bumcrot, D.A., Sasaki, H., McMahon, A.P., 1995. Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo 11.
- Martin, B.L., Kimelman, D., 2012. Canonical Wnt signaling dynamically controls multiple stem cell fate decisions during vertebrate body formation. *Dev. Cell* 22, 223–232.
- Martin, B.L., Kimelman, D., 2010. Brachyury establishes the embryonic mesodermal progenitor niche. *Genes Dev* 24, 2778–2783.
- Martínez-Hernández, R., Bernal, S., Also-Rallo, E., Alías, L., Barceló, M.J., Hereu, M., Esquerda, J.E., Tizzano, E.F., 2013. Synaptic defects in type I spinal muscular atrophy in human development. *J. Pathol.* 229, 49–61.
- Mathis, L., Kulesa, P.M., Fraser, S.E., 2001. FGF receptor signalling is required to maintain neural progenitors during Hensen’s node progression. *Nat Cell Biol* 3, 559–566.
- Mathis, L., Nicolas, J.F., 2000. Different clonal dispersion in the rostral and caudal mouse central nervous system. *Development* 127, 1277–1290.
- Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., Nedelec, S., 2015. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol* 33, 89–96.
- Mazzoni, E.O., Mahony, S., Closser, M., Morrison, C.A., Nedelec, S., Williams, D.J., An, D., Gifford, D.K., Wichterle, H., 2013. Synergistic binding of transcription factors to cell-specific enhancers programs motor neuron identity. *Nat Neurosci* 16, 1219–1227.
- McGrew, M.J., Sherman, A., Lilloco, S.G., Ellard, F.M., Radcliffe, P.A., Gilhooley, H.J., Mitrophanous, K.A., Cambray, N., Wilson, V., Sang, H., 2008. Localised axial progenitor cell populations in the avian tail bud are not committed to a posterior Hox identity. *Development* 135, 2289–2299.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J., 1999. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat. Genet.* 22, 260–264.
- Menasché, P., Vanneaux, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., Trouvin, J.-H., Fabreguettes, J.-R., Bellamy, V., Guillemain, R., Suberbielle Boissel, C., Tartour, E., Desnos, M., Larghero, J., 2015. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* 36, 2011–2017.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., Kissel, J.T., Nagendran, S., L’Italien, J., Sproule, D.M., Wells, C., Cardenas, J.A., Heitzer, M.D., Kaspar, A., Corcoran, S., Braun, L., Likhite, S., Miranda, C., Meyer, K., Foust, K.D., Burghes, A.H.M., Kaspar, B.K., 2017. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine* 377, 1713–1722.
- Mendell, L.M., Henneman, E., 1968. Terminals of Single Ia Fibers: Distribution within a Pool of 300 Homonymous Motor Neurons. *Science* 160, 96–98.
- Mendelsohn, A.I., Dasen, J.S., Jessell, T.M., 2017. Divergent Hox Coding and Evasion of Retinoid Signaling Specifies Motor Neurons Innervating Digit Muscles. *Neuron* 93, 792-805.e4.
- Mentis, G.Z., Blivis, D., Liu, W., Drobac, E., Crowder, M.E., Kong, L., Alvarez, F.J., Sumner, C.J., O’Donovan, M.J., 2011. Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neuron* 69, 453–467.
- Metzis, V., Steinhauser, S., Pakanavicius, E., Gouti, M., Stamataki, D., Ivanovitch, K., Watson, T., Rayon, T., Mousavy Gharavy, S.N., Lovell-Badge, R., Luscombe, N.M., Briscoe, J., 2018. Nervous System Regionalization Entails Axial Allocation before Neural Differentiation. *Cell*
- Meyer, B.I., Gruss, P., 1993. Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* 117, 191–203.
- Mitchelle, A., Watson, C., 2016. The organization of spinal motor neurons in a monotreme is consistent with a six-region schema of the mammalian spinal cord. *J. Anat.* 229, 394–405.
- Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K., Nakafuku, M., 2001. Combinatorial Roles of Olig2 and Neurogenin2 in the Coordinated Induction of Pan-Neuronal and Subtype-Specific Properties of Motoneurons. *Neuron* 31, 757–771.
- Moens, C.B., Selleri, L., 2006. Hox cofactors in vertebrate development. *Dev. Biol.* 291, 193–206.

- Morales, A.V., Espeso-Gil, S., Ocaña, I., Nieto-Lopez, F., Calleja, E., Bovolenta, P., Lewandoski, M., Diez Del Corral, R., 2016. FGF signaling enhances a sonic hedgehog negative feedback loop at the initiation of spinal cord ventral patterning. *Dev Neurobiol* 76, 956–971.
- Mosconi et Graham., 2017. Neuroscience for rehabilitation
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H., Takada, S., 2002. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* 16, 548–553.
- Nâdiya Roth., Le système nerveux autonome (<https://slideplayer.fr/slide/3549934/>)
- Naiche, L.A., Holder, N., Lewandoski, M., 2011. FGF4 and FGF8 comprise the wavefront activity that controls somitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4018–4023.
- Nakashima, M., Toyono, T., Akamine, A., Joyner, A., 1999. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 80, 185–189.
- Neijts, R., Amin, S., van Rooijen, C., Deschamps, J., 2017. Cdx is crucial for the timing mechanism driving colinear Hox activation and defines a trunk segment in the Hox cluster topology. *Developmental Biology* 422, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.024>
- Neijts, R., Amin, S., van Rooijen, C., Tan, S., Creyghton, M.P., de Laat, W., Deschamps, J., 2016. Polarized regulatory landscape and Wnt responsiveness underlie Hox activation in embryos. *Genes Dev.* 30, 1937–1942.
- Nelson, B.R., Hartman, B.H., Georgi, S.A., Lan, M.S., Reh, T.A., 2007. Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol* 304, 479–498.
- Nieuwkoop, P.D., Nigtevecht, G. v., 1954. Neural Activation and Transformation in Explants of Competent Ectoderm under the Influence of Fragments of Anterior Notochord in Urodeles. *Development* 2, 175–193.
- Nishimoto, S., Minguillon, C., Wood, S., Logan, M.P.O., 2014. A Combination of Activation and Repression by a Colinear Hox Code Controls Forelimb-Restricted Expression of Tbx5 and Reveals Hox Protein Specificity. *PLoS Genet* 10, e1004245.
- Noordermeer, D., Leleu, M., Splinter, E., Rougemont, J., De Laat, W., Duboule, D., 2011. The dynamic architecture of Hox gene clusters. *Science* 334, 222–225.
- Nordström, U., Jessell, T.M., Edlund, T., 2002. Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat. Neurosci.* 5, 525–532.
- Nordström, U., Maier, E., Jessell, T.M., Edlund, T., 2006. An Early Role for Wnt Signaling in Specifying Neural Patterns of Cdx and Hox Gene Expression and Motor Neuron Subtype Identity. *PLoS Biol* 4, e252.
- Novitsch, B.G., Wichterle, H., Jessell, T.M., Sockanathan, S., 2003. A Requirement for Retinoic Acid-Mediated Transcriptional Activation in Ventral Neural Patterning and Motor Neuron Specification. *Neuron* 40, 81–95.
- Noyes, M.B., Christensen, R.G., Wakabayashi, A., Stormo, G.D., Brodsky, M.H., Wolfe, S.A., 2008. Analysis of homeodomain specificities allows the family-wide prediction of preferred recognition sites. *Cell* 133, 1277–1289.
- Oberst, P., Agirman, G., Jabaudon, D., 2019. Principles of progenitor temporal patterning in the developing invertebrate and vertebrate nervous system. *Current Opinion in Neurobiology.*
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., Kageyama, R., 1999. Hes1 and Hes5 as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *The EMBO Journal* 18, 2196–2207.
- Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., Okano, H., 2004. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 275, 124–142.
- Okamoto, M., Miyata, T., Konno, D., Ueda, H.R., Kasukawa, T., Hashimoto, M., Matsuzaki, F., Kawaguchi, A., 2016. Cell-cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. *Nature Communications* 7, 11349.

- Olivera-Martinez, I., Harada, H., Halley, P.A., Storey, K.G., 2012. Loss of FGF-Dependent Mesoderm Identity and Rise of Endogenous Retinoid Signalling Determine Cessation of Body Axis Elongation. *PLoS Biol* 10, e1001415.
- Olivera-Martinez, I., Storey, K.G., 2007. Wnt signals provide a timing mechanism for the FGF-retinoid differentiation switch during vertebrate body axis extension. *Development* 134, 2125–2135.
- Panchision, D.M., Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.H., Turner, P.A., Hazel, T.G., McKay, R.D., 2001. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev.* 15, 2094–2110.
- Pang, D., Thompson, D.N.P., 2011. Embryology and bony malformations of the craniovertebral junction. *Childs Nerv Syst* 27, 523–564. <https://doi.org/10.1007/s00381-010-1358-9>
- Pankratz, M.T., Li, X.-J., LaVaute, T.M., Lyons, E.A., Chen, X., Zhang, S.-C., 2007. Directed Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells via an Obligated Primitive Anterior Stage. *Stem Cells* 25, 1511–1520.
- Patani, R., Hollins, A.J., Wishart, T.M., Puddifoot, C.A., Álvarez, S., de Lera, A.R., Wyllie, D.J.A., Compston, D.A.S., Pedersen, R.A., Gillingwater, T.H., Hardingham, G.E., Allen, N.D., Chandran, S., 2011. Retinoid-independent motor neurogenesis from human embryonic stem cells reveals a medial columnar ground state. *Nat Commun* 2, 214.
- Peljto, M., Dasen, J.S., Mazzoni, E.O., Jessell, T.M., Wichterle, H., 2010. Functional Diversity of ESC-Derived Motor Neuron Subtypes Revealed through Intraspinal Transplantation. *Cell Stem Cell* 7, 355–366.
- Pepper, J.-P., Wang, T.V., Hennes, V., Sun, S.Y., Ichida, J.K., 2017. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Motor Neuron Transplant for Neuromuscular Atrophy in a Mouse Model of Sciatic Nerve Injury. *JAMA Facial Plast Surg* 19, 197–205.
- Pera, M.F., Andrade, J., Houssami, S., Reubinoff, B., Trounson, A., Stanley, E.G., Ward-van Oostwaard, D., Mummery, C., 2004. Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J. Cell. Sci.* 117, 1269–1280. <https://doi.org/10.1242/jcs.00970>
- Pfaff, S.L., Mendelsohn, M., Stewart, C.L., Edlund, T., Jessell, T.M., 1996. Requirement for LIM Homeobox Gene *Isl1* in Motor Neuron Generation Reveals a Motor Neuron-Dependent Step in Interneuron Differentiation. *Cell* 84, 309–320.
- Philippidou, P., Dasen, J.S., 2013. Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization. *Neuron* 80, 12–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.020>
- Philippidou, P., Walsh, C.M., Aubin, J., Jeannotte, L., Dasen, J.S., 2012. Sustained Hox5 gene activity is required for respiratory motor neuron development. *Nat. Neurosci.* 15, 1636–1644.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., Jessell, T.M., 1999. A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97, 903–915.
- Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Goulding, M., Jessell, T.M., 2001. Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein *Dbx1*. *Neuron* 29, 367–384.
- Pilon, N., Oh, K., Sylvestre, J.-R., Bouchard, N., Savory, J., Lohnes, D., 2006. *Cdx4* is a direct target of the canonical Wnt pathway. *Developmental Biology* 289, 55–63.
- Pilon, N., Oh, K., Sylvestre, J.-R., Savory, J.G.A., Lohnes, D., 2007. Wnt signaling is a key mediator of *Cdx1* expression in vivo. *Development* 134, 2315–2323.
- Pollard, S.L., Holland, P.W., 2000. Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Curr. Biol.* 10, 1059–1062.
- Pollock, R.A., Jay, G., Bieberich, C.J., 1992. Altering the boundaries of *Hox3.1* expression: evidence for antipodal gene regulation. *Cell* 71, 911–923.
- Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., Caroni, P., 2006. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat. Neurosci.* 9, 408–419.
- Qu, Q., Li, D., Louis, K.R., Li, X., Yang, H., Sun, Q., Crandall, S.R., Tsang, S., Zhou, J., Cox, C.L., Cheng, J., Wang, F., 2014. High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of *Isl1*. *Nat Commun* 5, 3449.

- Ragagnin, A.M.G., Shadfar, S., Vidal, M., Jamali, M.S., Atkin, J.D., 2019. Motor Neuron Susceptibility in ALS/FTD. *Front. Neurosci.* 13, 532.
- Ravits, J.M., La Spada, A.R., 2009. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* 73, 805–811.
- Rekling, J.C., Funk, G.D., Bayliss, D.A., Dong, X.W., Feldman, J.L., 2000. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol. Rev.* 80, 767–852.
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., Ben-Hur, T., 2001. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1134–1140.
- Rhinn, M., Dolle, P., 2012. Retinoic acid signalling during development. *Development* 139, 843–858.
- Ribes, V., Stutzmann, F., Bianchetti, L., Guillemot, F., Dollé, P., Le Roux, I., 2008. Combinatorial signalling controls Neurogenin2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Developmental Biology* 321, 470–481.
- Rivera-Pérez, J.A., Magnuson, T., 2005. Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. *Developmental Biology* 288, 363–371.
- Roelen, B.A.J., de Graaff, W., Forlani, S., Deschamps, J., 2002. Hox cluster polarity in early transcriptional availability: a high order regulatory level of clustered Hox genes in the mouse. *Mechanisms of Development* 119, 81–90. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00329-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00329-5)
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Norlin, S., Altaba, A.R.I., Tanabe, Y., Placsek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., Dodd, J., 1994. Floor Plate and Motor Neuron Induction by vhh-1, a Vertebrate Homolog of the *Drosophila* *Winged* Gene. *Development* 120, 113–124.
- Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., 1995. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL
- Romanes, G.J., 1964. THE MOTOR POOLS OF THE SPINAL CORD. *Prog. Brain Res.* 11, 93–119.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O’Regan, J.P., Deng, H.X., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Rossi, A.M., Fernandes, V.M., Desplan, C., 2017. Timing temporal transitions during brain development. *Current Opinion in Neurobiology* 42, 84–92.
- Rouso, D.L., Gaber, Z.B., Wellik, D., Morrisey, E.E., Novitch, B.G., 2008. Coordinated Actions of the Forkhead Protein Foxp1 and Hox Proteins in the Columnar Organization of Spinal Motor Neurons. *Neuron* 59, 226–240.
- Sagner, A., Gaber, Z.B., Delile, J., Kong, J.H., Rouso, D.L., Pearson, C.A., Weicksel, S.E., Melchionda, M., Mousavy Gharavy, S.N., Briscoe, J., Novitch, B.G., 2018. Olig2 and Hes regulatory dynamics during motor neuron differentiation revealed by single cell transcriptomics. *PLoS Biol* 16, e2003127.
- Sances, S., Bruijn, L.I., Chandran, S., Eggan, K., Ho, R., Klim, J.R., Livesey, M.R., Lowry, E., Macklis, J.D., Rushton, D., Sadegh, C., Sareen, D., Wichterle, H., Zhang, S.-C., Svendsen, C.N., 2016. Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat Neurosci* 19, 542–553.
- Sasai, N., Kutejova, E., Briscoe, J., 2014. Integration of Signals along Orthogonal Axes of the Vertebrate Neural Tube Controls Progenitor Competence and Increases Cell Diversity. *PLOS Biology* 12, e1001907.
- Satoh, N., Jeffery, W.R., 1995. Chasing tails in ascidians: developmental insights into the origin and evolution of chordates. *Trends Genet.* 11, 354–359.
- Savory, J.G.A., Bouchard, N., Pierre, V., Rijli, F.M., De Repentigny, Y., Kothary, R., Lohnes, D., 2009. Cdx2 regulation of posterior development through non-Hox targets. *Development* 136, 4099–4110.
- Selleck, M.A.J., Stern, C.D., 1991. Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen’s node in the chick embryo 14.
- Shah, V., Drill, E., Lance-Jones, C., 2004. Ectopic expression of Hoxd10 in thoracic spinal segments induces motoneurons with a lumbosacral molecular profile and axon projections to the limb. *Dev. Dyn.* 231, 43–56.

- Sharma, K., Leonard, A.E., Lettieri, K., Pfaff, S.L., 2000. Genetic and epigenetic mechanisms contribute to motor neuron pathfinding 406, 5.
- Sharma, K., Sheng, H.Z., Lettieri, K., Li, H., Karavanov, A., Potter, S., Westphal, H., Pfaff, S.L., 1998. LIM Homeodomain Factors Lhx3 and Lhx4 Assign Subtype Identities for Motor Neurons. *Cell* 95, 817–828.
- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J.T., Fasano, C.A., Phoenix, T.N., Lemischka, I.R., Ivanova, N.B., Stifani, S., Morrisey, E.E., Temple, S., 2006. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nature Neuroscience* 9, 743–751.
- Shimizu, T., Bae, Y.-K., Muraoka, O., Hibi, M., 2005. Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation. *Dev. Biol.* 279, 125–141.
- Shimojo, D., Onodera, K., Doi-Torii, Y., Ishihara, Y., Hattori, C., Miwa, Y., Tanaka, S., Okada, R., Ohyama, M., Shoji, M., Nakanishi, A., Doyu, M., Okano, H., Okada, Y., 2015. Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *Mol Brain* 8, 79.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., Kageyama, R., 2011. Dynamic Expression of Notch Signaling Genes in Neural Stem/Progenitor Cells. *Front. Neurosci.* 5.
- Shin, S., Dalton, S., Stice, S.L., 2005. Human motor neuron differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 14, 266–269.
- Shneider, N.A., Brown, M.N., Smith, C.A., Pickel, J., Alvarez, F.J., 2009. Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival. *Neural Dev* 4, 42.
- Shum, A.S.W., Poon, L.L.M., Tang, W.W.T., Koide, T., Chan, B.W.H., Leung, Y.-C.G., Shiroishi, T., Copp, A.J., 1999. Retinoic acid induces down-regulation of Wnt-3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to a neural fate in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* 84, 17–30.
- Simon, R., Lufkin, T., 2003. Postnatal lethality in mice lacking the *Sax2* homeobox gene homologous to *Drosophila S59/slouch*: evidence for positive and negative autoregulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9046–9060.
- Small, K.M., Potter, S.S., 1993. Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. *Genes Dev.* 7, 2318–2328.
- Smith, C.L., Hollyday, M., 1983. The development and postnatal organization of motor nuclei in the rat thoracic spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 220, 16–28.
- Sockanathan, S., Perlmann, T., Jessell, T.M., 2003. Retinoid receptor signaling in postmitotic motor neurons regulates rostrocaudal positional identity and axonal projection pattern. *Neuron* 40, 97–111.
- Sokol, S., 1996. Analysis of Dishevelled signalling pathways during *Xenopus* development. - PubMed - NCBI [WWW Document]. PMID : 8939601
- Soshnikova, N., Duboule, D., 2009. Epigenetic regulation of vertebrate Hox genes: a dynamic equilibrium. *Epigenetics* 4, 537–540.
- Souza, P.V.S., Pinto, W.B.V.R., Aivazoglou, L.U., Cardoso, F.N., Aihara, A.Y., Yamada, A.F., Naylor, F.G.M., Fernandes, A.R.C., Oliveira, A.S.B., 2018. Distal myopathy due to BICD2 mutations. *Clin Neurol Neurosurg* 165, 47–49.
- Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S.V., Mynett, A., Briscoe, J., 2005. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev.* 19, 626–641.
- Stern, C.D., Charite, J., Deschamps, J., Duboule, D., Durston, A.J., Kmita, M., Nicolas, J.-F., Palmeirim, I., Smith, J.C., Wolpert, L., 2006. Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? *Int. J. Dev. Biol.* 50, 3–15.
- Stifani, N., 2014. Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Stifani, S., Ma, Q., 2009. ‘Runxs and regulations’ of sensory and motor neuron subtype differentiation: Implications for hematopoietic development. *Blood Cells Mol Dis* 43, 20–26.
- Stone, R.J., Stone, J.A., 2000. Atlas of skeletal muscles, 3rd ed. ed. Boston McGraw-Hill.
- Streeter, G.L., 1905. The development of the cranial and spinal nerves in the occipital region of the human embryo. *American Journal of Anatomy* 4, 83–116.

- Sun, X., Song, J., Huang, H., Chen, H., Qian, K., 2018. Modeling hallmark pathology using motor neurons derived from the family and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient-specific iPS cells. *Stem Cell Res Ther* 9, 315.
- Sweeney, L.B., Bikoff, J.B., Gabbito, M.I., Brenner-Morton, S., Baek, M., Yang, J.H., Tabak, E.G., Dasen, J.S., Kintner, C.R., Jessell, T.M., 2018. Origin and Segmental Diversity of Spinal Inhibitory Interneurons. *Neuron*.
- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsel-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., Montgomery, K.D., 2011. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 313–314.
- Takada, S., Stark, K.L., Shea, M.J., Vassileva, G., McMahon, J.A., McMahon, A.P., 1994. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* 8, 174–189.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2016. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takazawa, T., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Studer, L., Wichterle, H., MacDermott, A.B., 2012. Maturation of Spinal Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* 7, e40154.
- Takemoto, T., 2005. Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development* 133, 297–306.
- Takemoto, T., Uchikawa, M., Yoshida, M., Bell, D.M., Lovell-Badge, R., Papaioannou, V.E., Kondoh, H., 2011. Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural vs mesodermal fate in axial stem cells. *Nature* 470, 394–398.
- Tanabe, Y., Jessell, T.M., 1996. Diversity and Pattern in the Developing Spinal Cord. *Science* 274, 1115–1123.
- Tesarova, L., Simara, P., Stejskal, S., Koutna, I., 2016. The Aberrant DNA Methylation Profile of Human Induced Pluripotent Stem Cells Is Connected to the Reprogramming Process and Is Normalized During In Vitro Culture. *PLoS ONE* 11, e0157974.
- Thaler, J.P., Koo, S.J., Kania, A., Lettieri, K., Andrews, S., Cox, C., Jessell, T.M., Pfaff, S.L., 2004. A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron* 41, 337–350.
- Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., van den Aemele, J., 2012. Cortical neurogenesis and morphogens: Diversity of cues, sources and functions. *Current Opinion in Cell Biology*.
- Tosney, K.W., Landmesser, L.T., 1985a. Development of the major pathways for neurite outgrowth in the chick hindlimb. *Dev. Biol.* 109, 193–214.
- Tosney, K.W., Landmesser, L.T., 1985b. Specificity of early motoneuron growth cone outgrowth in the chick embryo. *J. Neurosci.* 5, 2336–2344.
- Trawczynski, M., Liu, G., David, B.T., Fessler, R.G., 2019. Restoring Motor Neurons in Spinal Cord Injury With Induced Pluripotent Stem Cells. *Front Cell Neurosci* 13.
- Tsakiridis, A., Huang, Y., Blin, G., Skylaki, S., Wymeersch, F., Osorno, R., Economou, C., Karagianni, E., Zhao, S., Lowell, S., Wilson, V., 2014. Distinct Wnt-driven primitive streak-like populations reflect in vivo lineage precursors. *Development* 141, 1209–1221.
- Tschopp, P., Christen, A.J., Duboule, D., 2012. Bimodal control of Hoxd gene transcription in the spinal cord defines two regulatory subclusters. *Development* 139, 929–939.
- Tschopp, P., Tarchini, B., Spitz, F., Zakany, J., Duboule, D., 2009. Uncoupling time and space in the collinear regulation of Hox genes. *PLoS Genetics*.
- Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S.B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T.M., Pfaff, S.L., 1994. Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* 79, 957–970.

- Turner, D.A., Hayward, P.C., Baillie-Johnson, P., Rue, P., Broome, R., Faunes, F., Martinez Arias, A., 2014. Wnt/ $\beta$ -catenin and FGF signalling direct the specification and maintenance of a neuromesodermal axial progenitor in ensembles of mouse embryonic stem cells. *Development* 141, 4243–4253.
- Tzouanacou, E., Wegener, A., Wymeersch, F.J., Wilson, V., Nicolas, J.-F., 2009. Redefining the Progression of Lineage Segregations during Mammalian Embryogenesis by Clonal Analysis. *Developmental Cell* 17, 365–376.
- van den Akker, E., Forlani, S., Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Beck, F., Meyer, B.I., Deschamps, J., 2002. Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 129, 2181–2193.
- van den Akker, E., Fromental-Ramain, C., de Graaff, W., Le Mouellic, H., Brûlet, P., Chambon, P., Deschamps, J., 2001. Axial skeletal patterning in mice lacking all paralogous group 8 Hox genes. *Development* 128, 1911–1921.
- van Nes, J., de Graaff, W., Lebrin, F., Gerhard, M., Beck, F., Deschamps, J., 2006. The Cdx4 mutation affects axial development and reveals an essential role of Cdx genes in the ontogenesis of the placental labyrinth in mice. *Development* 133, 419–428.
- van Rooijen, C., Simmini, S., Bialecka, M., Neijts, R., van de Ven, C., Beck, F., Deschamps, J., 2012. Evolutionarily conserved requirement of Cdx for post-occipital tissue emergence. *Development* 139, 2576–2583.
- Vermot, J., Schuhbaur, B., Le Mouellic, H., McCaffery, P., Garnier, J.-M., Hentsch, D., Brûlet, P., Niederreither, K., Chambon, P., Dollé, P., Le Roux, I., 2005. Retinaldehyde dehydrogenase 2 and Hoxc8 are required in the murine brachial spinal cord for the specification of Lim1+ motoneurons and the correct distribution of Islet1+ motoneurons. *Development* 132, 1611–1621.
- Verrier, L., Davidson, L., Gierliński, M., Dady, A., Storey, K.G., 2018. Neural differentiation, selection and transcriptomic profiling of human neuromesodermal progenitor-like cells *in vitro*. *Development* 145, dev166215.
- Wada, T., Honda, M., Minami, I., Tooi, N., Amagai, Y., Nakatsuji, N., Aiba, K., 2009. Highly Efficient Differentiation and Enrichment of Spinal Motor Neurons Derived from Human and Monkey Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* 4, e6722.
- Wahl, M.B., Deng, C., Lewandoski, M., Pourquie, O., 2007. FGF signaling acts upstream of the NOTCH and WNT signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development* 134, 4033–4041.
- Wang, L., Klein, R., Zheng, B., Marquardt, T., 2011. Anatomical Coupling of Sensory and Motor Nerve Trajectory via Axon Tracking. *Neuron* 71, 263–277.
- Wellik, D.M., 2009. Hox genes and vertebrate axial pattern. *Curr. Top. Dev. Biol.* 88, 257–278.
- Westbury, D.R., 1982. A comparison of the structures of alpha and gamma-spinal motoneurons of the cat. *J. Physiol. (Lond.)* 325, 79–91.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A., Jessell, T.M., 2002. Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells into Motor Neurons. *Cell* 110, 385–397.
- Wilson, L., Gale, E., Chambers, D., Maden, M., 2004. Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Developmental Biology* 269, 433–446.
- Wilson, L., Maden, M., 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology* 282, 1–13.
- Wilson, V., Olivera-Martinez, I., Storey, K.G., 2009. Stem cells, signals and vertebrate body axis extension 15.
- Wine-Lee, L., Ahn, K.J., Richardson, R.D., Mishina, Y., Lyons, K.M., Crenshaw, E.B., 2004. Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development* 131, 5393–5403.
- Woltering, J.M., Vonk, F.J., Müller, H., Bardine, N., Tuduice, I.L., de Bakker, M.A.G., Knöchel, W., Sirbu, I.O., Durston, A.J., Richardson, M.K., 2009. Axial patterning in snakes and caecilians: Evidence

- for an alternative interpretation of the Hox code. *Developmental Biology, Special Section: Evolution of Developmental Regulatory Systems* 332, 82–89.
- Wymeersch, F.J., Huang, Y., Blin, G., Cambray, N., Wilkie, R., Wong, F.C., Wilson, V., 2016. Position-dependent plasticity of distinct progenitor types in the primitive streak. *eLife* 5, e10042.
- Wymeersch, F.J., Skylaki, S., Huang, Y., Watson, J.A., Economou, C., Marek-Johnston, C., Tomlinson, S.R., Wilson, V., 2019. Transcriptionally dynamic progenitor populations organised around a stable niche drive axial patterning. *Development* 146, dev168161.
- Yamaguchi, T.P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N., McMahon, A.P., 1999. T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev.* 13, 3185–3190.
- Young, T., Deschamps, J., 2009. Chapter 8 Hox, Cdx, and Anteroposterior Patterning in the Mouse Embryo, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 235–255.
- Young, T., Rowland, J.E., Ven, C. van de, Bialecka, M., Novoa, A., Carapuco, M., Nes, J. van, Graaff, W. de, Duluc, I., Freund, J.-N., Beck, F., Mallo, M., Deschamps, J., 2009. Cdx and Hox Genes Differentially Regulate Posterior Axial Growth in Mammalian Embryos. *Developmental Cell* 17, 516–526.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Zhang, Q.-J., Li, J.-J., Lin, X., Lu, Y.-Q., Guo, X.-X., Dong, E.-L., Zhao, M., He, J., Wang, N., Chen, W.-J., 2017. Modeling the phenotype of spinal muscular atrophy by the direct conversion of human fibroblasts to motor neurons. *Oncotarget* 8, 10945–10953.
- Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brüstle, O., Thomson, J.A., 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1129–1133.
- Zurn, A.D., Winkel, L., Menoud, A., Djabali, K., Aebischer, P., 1996. Combined effects of GDNF, BDNF, and CNTF on motoneuron differentiation in vitro. *Journal of Neuroscience Research* 44, 133–141.





**Titre :** Etude des mécanismes du développement de la moelle épinière humaine par la mise en place de nouveaux modèles *in vitro* dérivés de cellules souches pluripotentes humaines

**Mots clés :** motoneurones, cellules souches pluripotentes, développement, moelle épinière, axe rostro-caudal

**Résumé :** La mise en place des circuits moteurs dépend, au cours du développement, de la spécification de plusieurs centaines de types de motoneurones distincts qui innervent les différents muscles du corps. En fonction de leur localisation le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière, les motoneurones acquièrent des propriétés particulières telles que la position de leurs corps cellulaires dans les différentes colonnes motrices et pools moteurs, la spécificité de leurs projections axonales vers leurs muscles cibles ou encore leurs propriétés électrophysiologiques. La formation de cette diversité se met en place au cours du développement embryonnaire. En effet, lors de l'élongation axiale de l'embryon, les différentes populations de motoneurones sont progressivement spécifiées depuis les premiers formés, les motoneurones cervicaux dans la partie rostrale, jusqu'aux derniers générés, les motoneurones sacrés dans la partie caudale. Cette diversification temporelle provient de la différenciation progressive de progéniteurs souches axiaux qui changent de destin au fil du temps pour ainsi donner naissance à des motoneurones différents à différents temps du développement. La diversification motoneuronale émerge donc de ces changements temporels dans les progéniteurs axiaux mais les mécanismes les régulant restent mal connus car leur étude *in vivo* est limitée chez l'animal et l'homme dû à la complexité des systèmes vivants et pour des raisons éthiques. Pour aborder cette question, j'ai donc tiré parti de la différenciation *in vitro* des cellules souches pluripotentes humaines pour mettre en place de nouveaux modèles du développement embryonnaire. Pour étudier les mécanismes donnant naissance aux différents types de motoneurones, j'ai d'abord déterminé, chez l'embryon humain, des combinaisons de facteurs de transcription qui identifient des sous-types de motoneurones spinaux situés à différents niveaux R-C de la moelle épinière. J'ai ensuite développé une stratégie pour générer, à partir des cellules souches humaines, des progéniteurs ayant les caractéristiques de progéniteurs axiaux. J'ai alors pu montrer que, comme chez l'embryon de souris, ces cellules changent progressivement de destin au cours du temps et génèrent séquentiellement différentes populations de motoneurones. J'ai alors disséqué les mécanismes sous-jacents à ces changements temporels et démontré qu'ils sont contrôlés par différents facteurs paracrines qui agissent séquentiellement sur ces cellules. La manipulation de ces facteurs permet alors de générer *in vitro*, avec une précision et une rapidité inégalées, des sous-types de motoneurones se trouvant à différentes positions R-C et innervant différents muscles du corps humain. Ces populations de motoneurones présentant des vulnérabilités différentes dans des maladies comme l'amyotrophie spinale ou la sclérose amyotrophique latérale, l'accès à ces cellules pourrait permettre la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le futur.

**Title:** Study of human spinal cord development mechanisms through the implementation using new *in vitro* models derived from human pluripotent stem cells

**Keywords:** motor neurons, pluripotent stem cells, development, spinal cord, rostro-caudal axis

**Abstract:** During development, the implementation of motor circuits depends on the specification of several hundred different types of motor neurons that innervate the different muscles of the body. Depending on their location along the rostro-caudal axis of the spinal cord, motor neurons acquire specific properties such as the position of their cell bodies in the different motor columns and motor pools, the specificity of their axonal projections towards their target muscles or their electrophysiological properties. The formation of this diversity takes place during embryonic development. Indeed, during the axial elongation of the embryo, the different populations of motoneurons are progressively specified from the first born motoneurons, the cervical motoneurons in the rostral part, to the last born, the Sacral motoneurons localized in the caudal part. This temporal diversification comes from the progressive differentiation of axial stem progenitors that change their destiny over time, thus giving rise to different motoneurons during the different times of development. Motor neuron diversification thus emerges from these temporal changes in the axial progenitors but the mechanisms regulating them remain poorly known because their study *in vivo* is limited in animals and humans due to the complexity of living systems and for ethical reasons. To address this issue, I have therefore taken advantage of the *in vitro* differentiation of human pluripotent stem cells to develop new models of embryonic development. To study the mechanisms giving rise to the different types of motor neurons, I first determined in the human embryo, the combinatorial transcriptional factors that identify subtypes of spinal motor neurons located at different R-C levels in the spinal cord. I then developed a strategy to generate, from human stem cells, progenitors with the characteristics of axial progenitors. I was then able to show that, as in the mouse embryo, these cells gradually change their fate over time and sequentially generate different populations of motoneurons. I then dissected the mechanisms underlying these temporal changes and showed that they are controlled by different paracrine factors that act sequentially on these cells. Manipulation of these factors then makes it possible to generate *in vitro*, with unparalleled precision and speed, subtypes of motoneurons located at different R-C positions and innervating different muscles of the human body. These populations of motor neurons present different vulnerabilities in diseases such as spinal muscular atrophy or amyotrophic lateral sclerosis, access to these cells could lead to the discovery of new therapeutic strategies in the future.