



HAL
open science

Contrôle de la prolifération cellulaire et développement du tube neural : régulation de l'expression des acteurs du cycle cellulaire Cycline D1 et CDC25B par le morphogène Shh.

Bertrand Benazeraf

► **To cite this version:**

Bertrand Benazeraf. Contrôle de la prolifération cellulaire et développement du tube neural : régulation de l'expression des acteurs du cycle cellulaire Cycline D1 et CDC25B par le morphogène Shh.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2005. Français. NNT : . tel-00012116

HAL Id: tel-00012116

<https://theses.hal.science/tel-00012116>

Submitted on 11 Apr 2006

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.

Année 2005

UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III

U.F.R SVT

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III

Spécialité : Biologie Moléculaire, Cellulaire et du Développement

Ecole Doctorale : Biologie-Santé-Biotechnologie (Toulouse)

Présentée par

Bertrand BENZAERAF

Le 4 Novembre 2005, 14h30 salle de conférence de l'IBCG

Titre :

**Contrôle de la prolifération cellulaire et développement du tube neural :
régulation de l'expression des acteurs du cycle cellulaire Cycline D1 et
CDC25B par le morphogène Shh.**

Directeur de thèse :

Melle F. PITUELLO, Directeur de Recherche, Toulouse.

JURY :

M. B. DUCOMMUN, Professeur à l'Université Paul Sabatier, Toulouse.	Président
Mme C. JESSUS, Directeur de Recherche, Paris.	Rapporteur
M. A. RUIZ I ALTABA, Directeur de Recherche, Genève.	Rapporteur
Mme J. NARDELLI, Chargée de Recherche, Paris.	Examineur

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547 CNRS/UPS

Université Paul Sabatier-Toulouse III

118, route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 4

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Alain Vincent pour m'avoir accueilli au Centre de Biologie du développement et pour m'avoir fait profiter de ses commentaires scientifiques avisés.

Je remercie Bernard Ducommun pour son intérêt à ce travail et pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie Catherine Jessus, Ariel Ruiz i Altaba d'avoir accepté d'être rapporteurs, ainsi que Jeannette Nardelli d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Je remercie très chaleureusement Fabienne Pituello de m'avoir encadré lors de mon doctorat. De part ses qualités humaines et scientifiques Fabienne m'a apporté une formation de grande valeur au cours de ces années de thèse.

Je souhaite remercier tous les gens qui ont travaillé à mes côtés dans l'équipe : Laurence, Sophie, Emilie, Valérie, Orély, Virginie, Chen, François, Nicolas. Je remercie en particulier François, pour son aide précieuse en biologie moléculaire. Un grand merci à Valérie d'avoir accepté de partager avec moi le projet concernant l'étude des Cyclines D, je garde un très bon souvenir de cette synergie fructueuse. Je tiens aussi à remercier Chen et Emilie pour leur participation au travail sur la régulation de CDC25B.

Merci à Muriel Quaranta et Céline Réyès pour m'avoir aidé à utiliser le cytomètre de flux.

Je souhaite remercier les membres de l'équipe de Cathy et Philippe pour leur aide, leur dynamisme et leur bonne humeur. Je remercie spécialement Cathy Soula pour m'avoir donné goût à la recherche en biologie du développement lors de mon stage de DESU.

Merci à mes collègues et amis thésards qui m'ont accompagné dans cette aventure, je pense en particulier à Cathy, Séb, Julie, Cédric, Rich, Patrice, Chadi, Steph, Manu, à ma promo de DEA.

Un grand merci à tous les membres du CBD pour l'ambiance chaleureuse et constructive qui règne dans ce laboratoire.

Je souhaite enfin remercier ma mère et mes amis que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés et qui m'ont soutenu tout au long de ces années de travail.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	8
I/ Développement de l'ébauche de moelle épinière.	12
A/ Formation du tube neural.	12
B/ Maturation de l'ébauche de moelle épinière selon l'axe antero-postérieur.	14
a) Changement d'état transcriptionnel à la transition gouttière neural tube neural.	14
b) La morphogenèse du tissu neural selon l'axe antéro postérieur s'accompagne de la maturation progressive des précurseurs neuraux.	18
d) Rôle du mésoderme somitique et de la voie de l'acide rétinoïque dans la maturation du tube neural.	23
e) Antagonisme des voies de signalisation FGF et acide rétinoïque.	26
C/ Genèse des différentes populations neuronales de la moelle épinière selon l'axe dorso-ventral.	28
a) Spécification des populations de neurones dans l'ébauche de moelle épinière.	28
1) Les neurones ventraux.	28
1.1) La corde et la plaque du plancher ont des propriétés ventralisantes sur le tube neural.	28
1.2) Le morphogène Shh est responsable de la spécification des populations neuronales ventrales dans le tube neural.	29
1.3) Transduction du signal Shh et régionalisation du tube neural ventral.	32
1.4) Mise en place des différents domaines de précurseurs neuraux ventraux. ...	38
2) Les neurones dorsaux.	39
b) De la spécification à la différenciation neuronale.	40
D/ Contrôle de la prolifération pendant le développement de la moelle épinière.	44
a) Paramètres de la prolifération dans le tube neural.	44
b) Contrôle de la prolifération dans le tube neural dorsal.	45
c) Contrôle de la prolifération dans le tube neural ventral.	45
II/ La voie de signalisation Shh dans le développement et le contrôle de la prolifération cellulaire.	48
A/ Signalisation Shh et développement.	48
B/ Régulateurs du cycle cellulaire.	56
C/ Liens entre Shh et les régulateurs du cycle cellulaire.	57
RESULTATS	60
I/ Contrôle de la prolifération dans l'ébauche de moelle épinière : Régulations et fonctions des Cyclines D1 et D2.	62
A/ Synthèse de l'article.	62
B/ ARTICLE.	64
C/ Résultats supplémentaires liés au premier article.	84
a) Recherche des kinases dépendantes des Cyclines D exprimées dans l'ébauche de moelle épinière.	84
b) Analyse de l'influence de la fonction des Cyclines D1 et D2 sur leur propre expression.	84
c) Evolution des paramètres du cycle cellulaire au cours de la maturation du neuroépithélium.	88

II/ Shh régule l'expression d'un régulateur de la transition G2/M dans l'ébauche de moelle épinière : la phosphatase CDC25B.	90
A/ Synthèse de l'article.	90
B/ ARTICLE.	92
C/ Résultats supplémentaires liés au deuxième article.	124
a) Caractérisation des isoformes de <i>CDC25B</i> présentes dans le tube neural de poulet.	124
b) Analyse de la densité mitotique selon l'axe dorso-ventral du tube neural.	128
c) Analyse de l'influence de la voie de signalisation Shh sur la transition G2 /M dans les précurseurs neuraux.	130
DISCUSSION	134
1/ L'expression de <i>Cycline D2</i> fait partie du programme caudalisant médié par la signalisation FGF.	136
2/ L'expression de <i>Cycline D1</i> est régulée par la voie de signalisation Shh.	137
3/ Les Cyclines D favorisent la prolifération des précurseurs neuraux au détriment de leur différenciation.	139
4/ Régulation de l'expression des phosphatases CDC25 pendant le développement de l'ébauche de moelle épinière.	141
5/ La voie de signalisation Shh agit à la phase G1 et la transition G2/M du cycle cellulaire.	144
6/ Significations potentielles d'un contrôle à la transition G2/M dans les cellules précurseurs du tube neural.	146
7/ Modèle du rôle de la prolifération dépendante de Shh dans la régionalisation tissulaire.	150
CONCLUSION	154
BIBLIOGRAPHIE	158
SUMMARY	176

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formation du tube neural

Figure 2 : Fermeture progressive du tube neural selon l'axe antéro-postérieur

Figure 3 : Maturation progressive du tissu neural au cours de l'allongement caudal de l'embryon.

Figure 4 : Mouvements interkinétiques du noyau au sein du neuroépithélium.

Figure 5 : Organisation en coupe transversale de la moelle épinière en développement

Figure 6 : Les voies de signalisation du FGF et de l'acide rétinoïque.

du FGF et de l'acide rétinoïque contrôlent la maturation du neuroépithélium.

Figure 7 : Les voies du FGF et de l'acide rétinoïque contrôlent la maturation du neuroépithélium.

Figure 8 : Schéma montrant les six classes de neurones dorsaux (dl1 à dl6) et les 5 classes de neurones ventraux (V0 à V3 + motoneurones) dans la moelle épinière.

Figure 9 : SHH agit comme un morphogène dans la partie ventrale du tube neural.

Figure 10 : Représentation simplifiée de la signalisation de Shh.

Figure 11 : Établissement des différents domaines de précurseurs neuraux dans la partie ventrale du tube neural par une combinatoire de facteur de transcription.

Figure 12 : Densité mitotique dans le tube neural au cours du développement de la moelle épinière.

Figure 13 : Représentation simplifiée de la cascade moléculaire impliquée dans la mise en place de l'asymétrie gauche / droite chez l'embryon de poulet stade 4HH.

Figure 14 : Développement du bourgeon de membre.

Figure 15 : Rôle prolifératif de Shh dans le cervelet.

Figure 16 : Mécanismes de régulation du cycle cellulaire.

Figure 17 : Patron d'expression de CDK6 au cours de la maturation de la moelle épinière.

Figure 18 : Analyse de la surexpression des Cyclines D1 sur l'expression de Cycline D2 et de la surexpression de la Cycline D2 sur l'expression de Cycline D1.

Figure 19 : Analyse par cytométrie de flux de la répartition des précurseurs neuraux dans les différentes phases du cycle cellulaire au cours de la maturation du neuroépithélium.

Figure 20 : Comparaison des isoformes de CDC25B isolées dans le tube neural de poulet avec les isoformes humaines de CDC25B.

Figure 21 : Analyse de la densité mitotique selon l'axe dorso-ventral dans le tube neural d'un embryon de stade 13 HH.

Figure 22 : Analyse de l'effet de l'inhibition de la voie Shh sur la mitose et la répartition de des précurseurs neuraux dans le cycle cellulaire.

Figure 23 : Modèles de l'action de Shh à la phase G1 et à la transition G2/M sur le destin des cellules précurseurs neuraux.

Figure 24 : Modèle d'intégration de la prolifération dans l'effet morphogène de Shh.

ABREVIATIONS

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AER : Apical Ectodermal Ridge
ARN : Acide Ribonucléique
BHLH : basic Helix-Loop-Helix
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BrdU : Bromodéoxyuridine
BSA : Bovin Serum Albumine
CAK : Kinase activatrice des CDK
CDK : Cyclin dependent kinase
CDC : Cycle de division cellulaire
Ci : *Cubitus interruptus*
CKI : Cyclin-dependent kinase inhibitor
DI : dorsal interneuron
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
GFP : Green Fluorescent Protein
H3-P : Histone 3 phosphorylée
HBC : 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin
HD : Homéodomaine
Hh : Hedgehog
HH : Hamburger-Hamilton (auteurs d'une table de développement du poulet)
HIS : Hybridation *in situ*
MN : Motoneurone
MPF : M phase promoting factor.
Ngn : Neurogenin
Pax : Paired-type box
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PBS : Phosphate Buffer Saline
PP : Plaque du plancher
PSM : presomitic mesoderm
PT : Plaque du Toit
Ptc : Patched
RALDH2 : rétinoldehyde dehydrogenase-2
RB : Protéine du rétinoblastome
Shh : Sonic hedgehog
Smo : Smoothened
SNC : Système Nerveux Central
TGF β : Transforming growth factor beta
Thr : Thréonine
Tyr : tyrosine
VAD : Vitamin A deficient (caille déficiente en vitamine A)
ZPA : zone d'activité polarisante

INTRODUCTION

Le système nerveux central des Vertébrés est formé de l'encéphale dans sa partie antérieure et de la moelle épinière dans sa partie postérieure. De part ses fonctions et son organisation stéréotypée la moelle épinière constitue un modèle d'étude plus simple que l'encéphale. Les principales fonctions de la moelle épinière sont de transmettre les informations sensorielles vers l'encéphale et les informations motrices vers les muscles. L'organisation des sous populations neuronales responsables de ces fonctions est régionalisée selon l'axe dorso ventral au sein de la moelle épinière. Ainsi les neurones moteurs et les interneurons associés à la fonction motrice sont localisés dans la moitié ventrale de la moelle épinière alors que plusieurs populations d'interneurones sensoriels sont localisées dans la région dorsale. Des interneurons assurent le relais entre neurones moteurs et neurones sensoriels.

Le fonctionnement harmonieux de la moelle épinière nécessite la mise en place des différents sous types neuronaux à des positions définies et en nombre approprié. Pour cela les événements de spécification, de prolifération et de différenciation des précurseurs neuronaux doivent être coordonnés pendant le développement de cette structure.

Dans l'introduction de cette thèse nous allons tout d'abord détailler le développement de la moelle épinière. Nous allons par la suite nous intéresser à la voie de signalisation Shh qui est impliquée dans la régionalisation de la partie ventrale du tube neural et voir quels sont ses liens avec le contrôle de la prolifération.

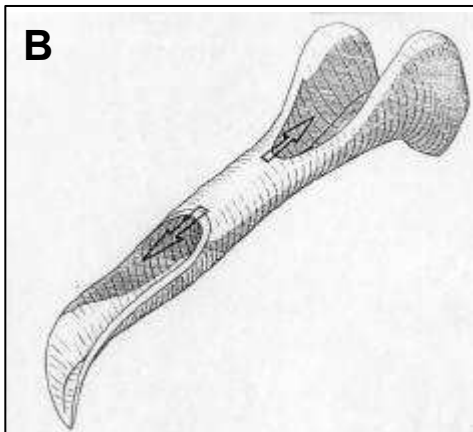
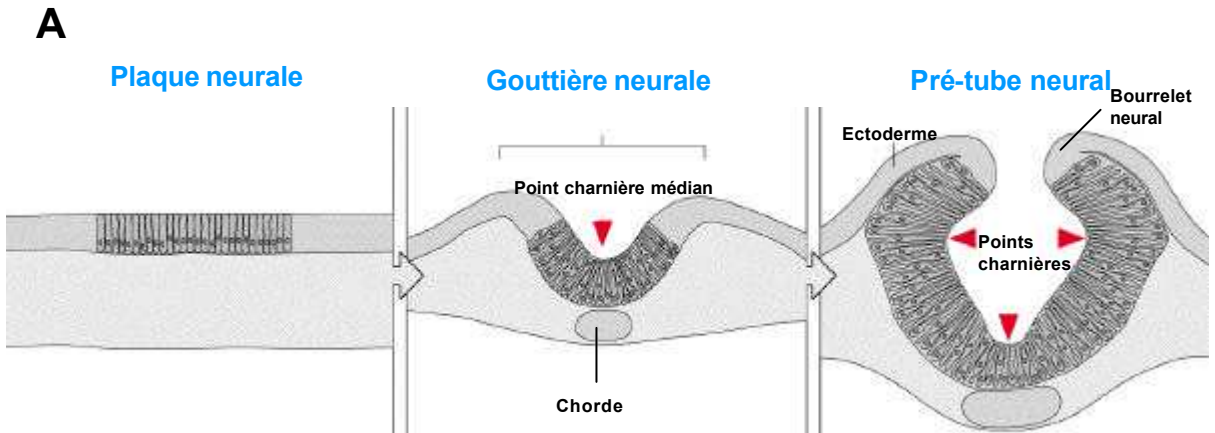


Figure 1 : Formation du tube neural

A: Le processus de l'induction neurale conduit à la formation de la plaque neurale. Les bords de la plaque neurale se soulèvent pour former la gouttière neurale. Le tube neural se forme par fermeture dorsale de la gouttière neurale. (D'après *Principles of development*, second edition, Lewis Wolpert)

B: La fermeture du tube neural à l'origine de la moelle épinière se déroule progressivement des régions antérieures vers les régions postérieures.

I/ Développement de l'ébauche de moelle épinière.

A/ Formation du tube neural.

Chez les vertébrés, le tissu neural dérive de l'ectoderme, feuillet embryonnaire situé sur la face dorsale de l'embryon. L'induction neurale est le phénomène qui va orienter les cellules de l'ectoderme vers un destin neural. A la suite de l'induction neurale, l'ectoderme se partage en deux domaines distincts : le domaine neural ou plaque neurale et le domaine non neural. Le domaine ectodermique non neural situé latéralement formera l'épiderme. La plaque neurale se fermera en tube neural qui va donner naissance au cerveau dans sa partie antérieure et à la moelle épinière dans sa partie postérieure. La formation du tube neural se fait par les processus de neurulation : la neurulation primaire va donner les régions cervico-thoraciques de la moelle épinière et la neurulation secondaire par cavitation va donner les régions lombaires et sacrées (Le Douarin et al., 1998).

Au cours de la neurulation primaire la plaque neurale va subir une succession d'évènements morphogénétiques qui vont l'amener à se replier pour former le tube neural. L'induction neurale va d'abord induire un changement de morphologie des cellules de la plaque neurale qui vont former une structure épithéliale pseudo-stratifiée. Ces changements de morphologie des cellules conduisent à un épaississement de la structure. La plaque neurale au contact des tissus environnants forme trois points charnières : un médian et deux dorso-latéraux (figure 1A). Les cellules qui constituent ces points charnières acquièrent une forme triangulaire nécessaire à la formation d'encoignures dans la plaque neurale. Après la formation de la charnière médiane les bords de la plaque neurale s'épaississent et se soulèvent, ils forment les bourrelets neuraux. La plaque neurale se courbe et forme la gouttière neurale. Par la suite les bourrelets neuraux vont se rapprocher puis fusionner, la gouttière neurale devient alors le tube neural (figure 1A) (pour revue voir (Colas and Schoenwolf, 2001)). De manière concomitante à la fusion des bourrelets neuraux l'ectoderme épidermique se détache du neuroépithélium et forme l'ectoderme dorsal. La fermeture du tube neural n'a pas lieu de façon simultanée le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon : chez le poulet elle débute dans la région du mésencéphale puis progresse rostralement et caudalement (figure 1B). Chez un embryon de poulet à un jour et demi de développement (stade 10 HH) (Hamburger and Hamilton, 1992) les états plaque neurale, gouttière neurale et tube neural coexistent le long de l'axe antéro-postérieur. En effet, le développement de

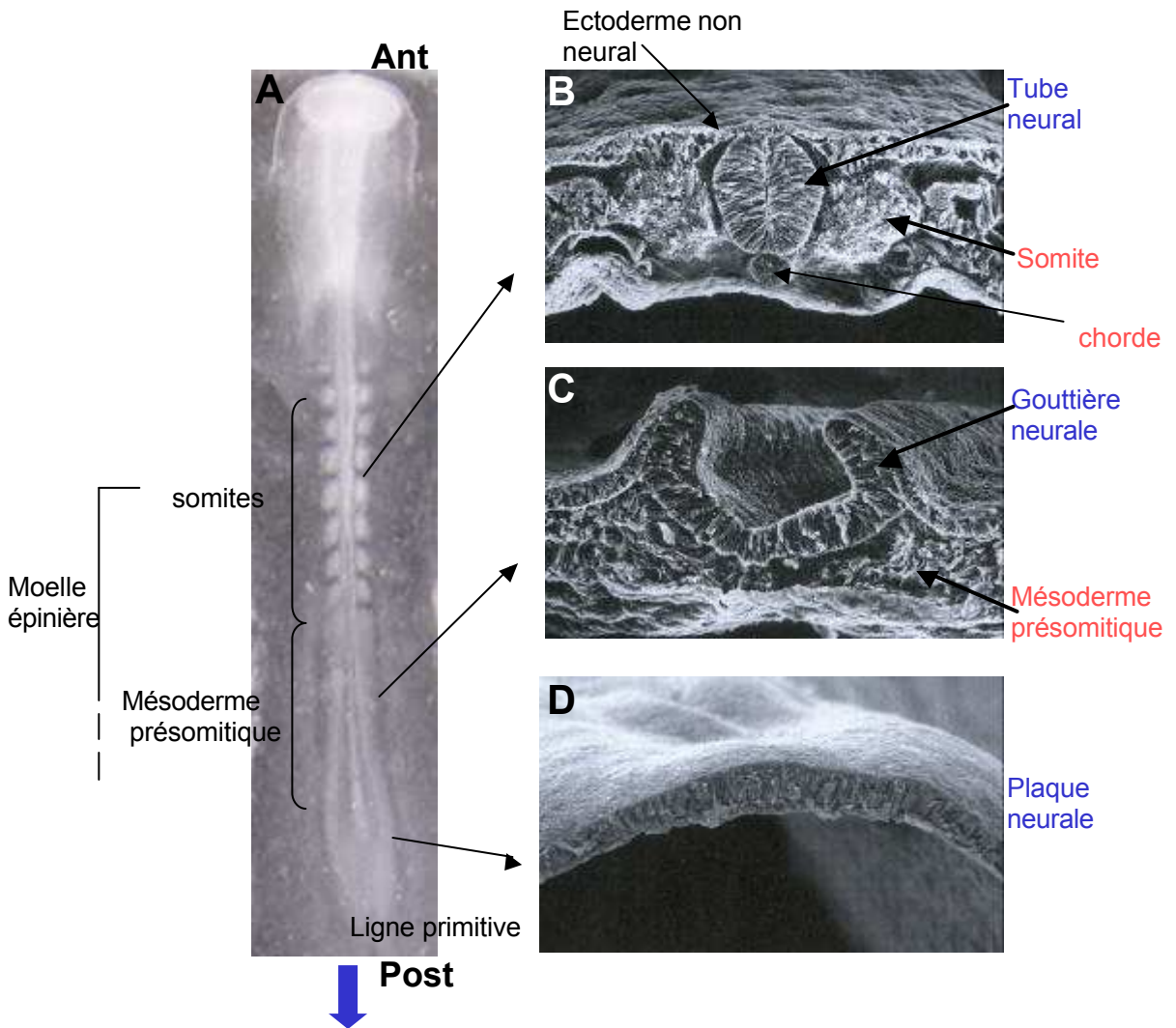


Figure 2 : Fermeture progressive du tube neural selon l'axe antéro-postérieur.

Les états plaque neurale (D), gouttière neurale (C) et tube neural (B) coexistent le long de l'axe antéro-postérieur d'un embryon de poulet au stade 8 somites (A). Le tube neural est entouré ventralement par la chorde, dorsalement par l'ectoderme non neural et latéralement par les somites, composante segmentée du mésoderme paraxial (A, B). Au contact de la plaque et de la gouttière neurale, le mésoderme paraxial n'est pas segmenté et est nommé mésoderme présomitique (A, C). Au cours de l'allongement caudal de l'embryon (flèche en A), la gouttière neurale va progressivement se fermer pour former le tube neural et parallèlement, le mésoderme va se segmenter.

l'embryon progresse rostro-caudalement et la plaque neurale qui est la région la plus jeune se situe postérieurement à la gouttière neurale elle même située de manière postérieure au tube neural (figure 2). Cet embryon constitue de ce fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes qui régissent les phases précoces de la maturation de la moelle épinière.

Le tube neural est au contact de plusieurs structures non neurales. Comme décrit précédemment l'ectoderme non neural est situé en position dorsale par rapport au tube neural. Sous le tube neural se situe une structure mésodermique axiale, la corde, qui est déposée par le nœud de Hensen au cours de la régression de la ligne primitive pendant l'allongement antéro-postérieur de l'embryon (Catala et al., 1996). De part et d'autre de la plaque et de la gouttière neurale se trouve le mésoderme paraxial non segmenté (PSM). Au fur à mesure de l'allongement antéro postérieur de l'embryon, en phase avec la fermeture du tube neural, le PSM va se segmenter en structures épithéliales arrondies, les somites. Les somites donneront plus tard le squelette axial, les muscles et le derme du tronc. Nous verrons par la suite que l'ectoderme dorsal, le mésoderme axial et paraxial ont une influence considérable sur le développement du tube neural.

B/ Maturation de l'ébauche de moelle épinière selon l'axe antéro-postérieur.

a) Changement d'état transcriptionnel à la transition gouttière neural tube neural.

La maturation progressive du tube neural s'accompagne d'un changement de l'état transcriptionnel des cellules à la transition gouttière neurale tube neural. La plaque et la gouttière neurale sont caractérisées par l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Ces structures expriment l'homologue du gène *Achaete-scute* de drosophile *Cash4* (Henrique et al., 1997) (Storey et al., 1998) (Diez del Corral et al., 2002), et le gène à homéodomaine *Sax1* (Bertrand et al., 2000; Diez del Corral et al., 2002; Spann et al., 1994). Pendant la neurulation primaire la limite d'expression de ces gènes recule caudalement au cours de la régression du nœud de Hensen et de la segmentation progressive du mésoderme paraxial. L'extinction de ces gènes s'accompagne de l'apparition au niveau du tube neural d'autres facteurs de transcription impliqués dans la régionalisation dorso-ventrale du tube neural et dans la spécification des cellules précurseurs neuraux. Ainsi les gènes *Pax6* et *Irx3*, sont exprimés dans le tube neural et pas dans la gouttière ni dans la plaque neurale (Bertrand et al.,

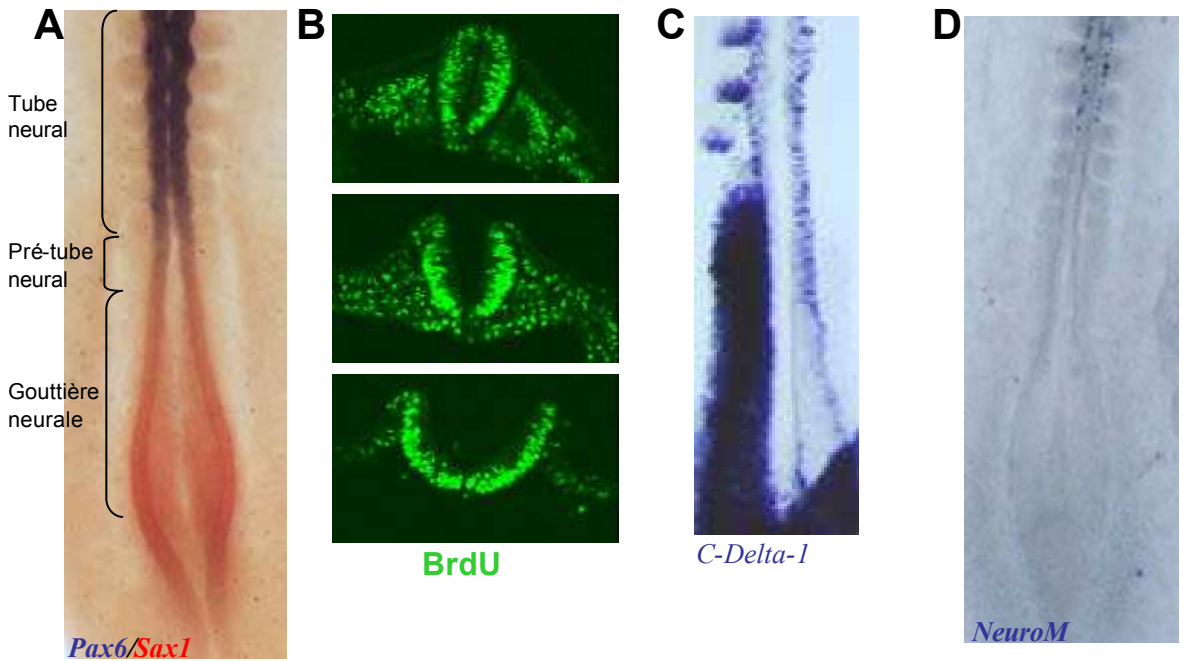


Figure 3 : Maturation progressive du tissu neural au cours de l'allongement caudal de l'embryon.

La plaque et la gouttière neurale sont caractérisées par l'expression de *Sax1*. Ce facteur n'est plus exprimé dans le tube neural où d'autres facteurs tel que *Pax6* sont exprimés (**A**: double hybridation *in situ* *Pax6* (en bleu)/ *Sax1* (en rouge) sur un embryon au stade HH 9-10). Ainsi, la transition gouttière neurale-tube neural s'accompagne d'une modification du programme transcriptionnel. Dans la gouttière neurale, le pré-tube et le tube neural, la majorité des précurseurs neuraux sont en prolifération (**B**: incorporation de BrdU sur un embryon au stade HH 9-10). Les premières cellules post-mitotiques, repérées par l'expression de *C-Delta1* (**C**) apparaissent au niveau du pré-tube neural. Les premiers neurones positifs pour le marqueur de différenciation *NeuroM* apparaissent plusieurs heures après dans le tube neural (**D**). Localisation des zones de prolifération, sortie de cycle et différenciation dans la région du tube gouttière et et plaque neurale d'un embryon au stade 10HH (**E**).

2000; del Corral et al., 2003). Leurs expressions progressent de façon rostro caudale de manière concomitante avec la somitogenèse au cours du développement.

Il existe donc un programme transcriptionnel spécifique de la plaque et de la gouttière neurale caractérisé par l'expression des gènes *Cash4* ou *Sax1* et l'absence d'expression de *Pax6* et *Irx3*. Par la suite les cellules adoptent un programme transcriptionnel spécifique du tube neural caractérisé par l'extinction des gènes caudaux et l'activation des gènes *Pax6* et *Irx3* (figure 3A).

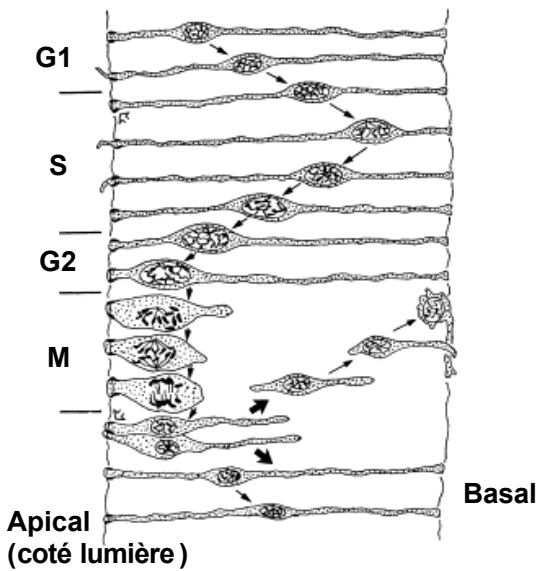
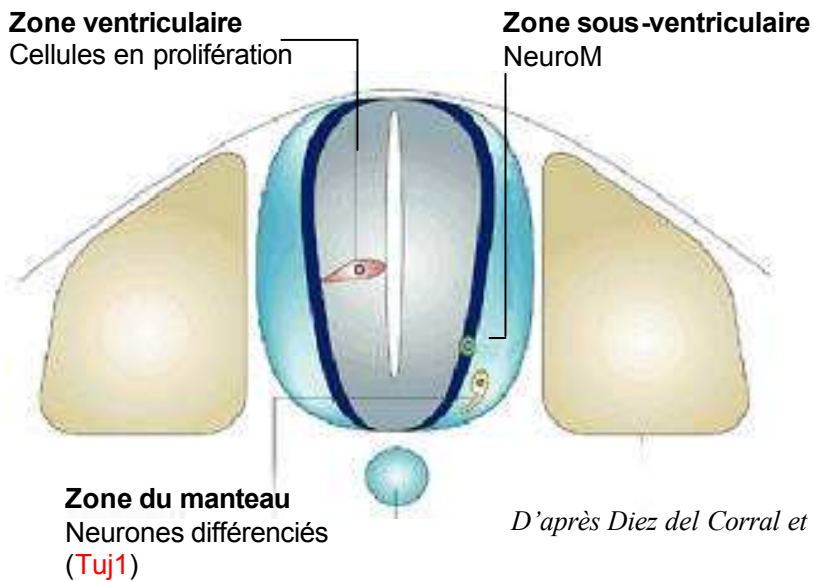


Figure 4: Mouvements interkinétiques du noyau au sein du neuroépithélium.

Les noyaux des précurseurs neuraux effectuent une migration apico-basale en relation avec les différentes phases du cycle cellulaire. Les figures de mitose sont toujours adjacentes à la lumière du tube neural et les cellules en phase S ont leurs noyaux localisés dans la moitié basale du neuroépithélium. Après la cytokinèse, les cellules filles peuvent soit entrer dans un nouveau cycle cellulaire soit quitter le cycle cellulaire et migrer vers la zone sous-ventriculaire pour se différencier.



D'après Diez del Corral et Storey, 2001

Figure 5 : Organisation en coupe transversale de la moelle épinière en développement.

La zone ventriculaire en position centrale est constituée de cellules en prolifération. Les précurseurs sélectionnés pour se différencier, arrêtent de se diviser et migrent latéralement. Au cours de cette migration, les cellules expriment des marqueurs de plus en plus tardifs de différenciation. Elles se localisent d'abord au niveau de la zone sous-ventriculaire où elles expriment des marqueurs précoces de différenciation neuronale tel NeuroM, puis au niveau de la zone du manteau où elles expriment des marqueurs plus tardifs de différenciation.

b) La morphogenèse du tissu neural selon l'axe antéro-postérieur s'accompagne de la maturation progressive des précurseurs neuraux.

Le neuroépithélium est un épithélium pseudo stratifié. Ainsi, chaque cellule s'étend sur toute l'épaisseur de cette structure. Les cellules au sein du neuroépithélium sont en prolifération, définissant ainsi la zone ventriculaire. Les noyaux de ces cellules effectuent une migration le long de l'axe apico-basal appelée migration interkinétique (figure 4). La position des noyaux est en étroite relation avec les phases du cycle cellulaire. Les cellules en mitose sont situées au bord de la lumière du tube neural et les noyaux des cellules en phase de réplication d'ADN (phase S) sont situés dans la moitié basale du neuroépithélium. Pendant que les cellules quittent la phase S pour rentrer en phase G2 du cycle cellulaire leur noyau migre vers la lumière. A l'entrée en mitose, les cellules perdent leur attachement à la lame basale et s'arrondissent pour se diviser. Après la cytokinèse, les cellules filles entrent dans un autre cycle ou quittent le cycle cellulaire. Les cellules filles qui restent dans le cycle cellulaire (phase G1) ont leur membrane qui s'étend vers la lame basale et leur noyau qui migre du lumen vers la lame basale avant de recommencer un nouveau cycle de réplication. Les cellules qui quittent le cycle cellulaire perdent, ou ne renouvellent pas, leur attachement coté apical et migrent du coté basal pour se localiser en bordure des cellules en prolifération, dans la zone sous ventriculaire (Hollyday, 2001). Au cours de leur différenciation les cellules se localisent dans la zone du manteau, future substance grise de la moelle épinière (Diez del Corral and Storey, 2001) (figure 5).

Des expériences d'incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU) et de marquage à la thymidine tritiée montrent qu'à l'exception de certains précurseurs d'interneurones du rhombencéphale qui quittent le cycle cellulaire très tôt au cours du développement (stade HH4) (McConnell and Sechrist, 1980; Sechrist and Bronner-Fraser, 1991), la plaque et la gouttière neurale contiennent en majorité des cellules en prolifération dans un état indifférencié (figure 3B). Les cellules postmitotiques vont apparaître progressivement selon une séquence rostro caudale en suivant l'allongement antéro-postérieur de l'embryon. Le marqueur Delta qui est considéré comme un marqueur post mitotique précoce apparaît au niveau de la fermeture du tube neural d'embryon de stade 7-10 somites (Henrique et al., 1995) (figure 3C). Les cellules ayant quitté le cycle cellulaire vont par la suite entamer leur processus de différenciation neuronale.

L'étude des marqueurs de différenciation neuronale comme le facteur de transcription à domaine bHLH *Neuro M* montre que les premiers neurones différenciés apparaissent

progressivement dans le tube neural selon une séquence rostro caudale d'activation quelques heures après l'apparition du marqueur Delta (Roztocil et al., 1997) (figure 3D). Un autre marqueur de différenciation plus tardif la tubuline de type III TUJ1 apparaît plus rostralement selon la même séquence temporelle d'activation (Yaginuma et al., 1990).

En plus d'un changement de l'état transcriptionnel, la morphogenèse du tube neural selon l'axe antéro-postérieur s'accompagne donc de la maturation progressive des précurseurs neuraux. Les précurseurs sont en prolifération dans un état indifférencié au niveau de la plaque neurale. Au niveau de la gouttière neurale quelques cellules vont quitter le cycle cellulaire mais la majorité des précurseurs neuraux prolifèrent. Dans le tube neural, on trouve à la fois des cellules en prolifération, des cellules qui quittent le cycle cellulaire et des cellules qui ont entamé leur processus de différenciation neuronale (figure 3E).

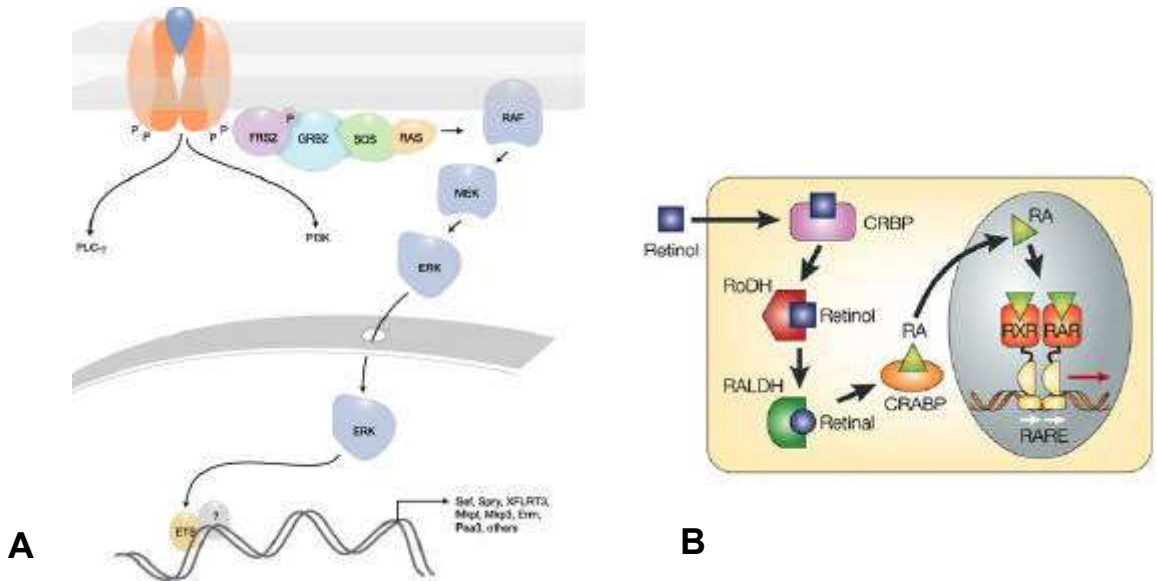


Figure 6 : Les voies de signalisation du FGF et de l'acide rétinoïque.

A) La voie de signalisation FGF. La liaison du FGF à son récepteur entraîne la dimérisation du récepteur et déclenche son autophosphorylation par activation des tyrosine kinases. Cette autophosphorylation va servir à l'assemblage d'un complexe qui va permettre la transduction du signal. La transduction du signal peut se faire par trois voies majeures: la voie Ras/MAPK qui mène à l'activation par phosphorylation de facteur de transcription comme ETS, la voie de la PLC γ , et la voie de la PI3K; (d'après Tsang et al. STKE, 2004) B) La voie de l'acide rétinoïque. Le rétinol se lie à la CRBP dans le cytoplasme puis est métabolisé en acide rétinoïque par la rétinol déshydrogénase (RoDH) et la rétinolaldéhyde déshydrogénase (RALDH), l'acide rétinoïque est lié dans le cytoplasme par la CRABP (cellular RA binding protein). L'acide rétinoïque rentre dans le noyau de la cellule receveuse ou il se lie à des récepteurs (RAR et RXR) qui s'hétérodimérisent pour venir se fixer à des séquences de l'ADN (RARE) situées sur les gènes cibles et permettre leur activation.(d'après Maden, 2002)

c) Rôle du mésoderme présomitique et de la voie FGF dans le maintien de la gouttière neurale dans un état jeune.

Le mésoderme présomitique intervient dans le changement d'état transcriptionnel à la transition gouttière neurale tube neural. Une délétion de mésoderme présomitique entraîne au bout de quelques heures la disparition des marqueurs *Sax1* et *Cash 4* et l'expression ectopique de *Pax6* ou *Irx3* dans la gouttière neurale (Bertrand et al., 2000), (Diez del Corral et al., 2002), (del Corral et al., 2003). Des greffes de PSM contre le tube neural inhibent l'expression du gène *Pax6* (Pituello et al., 1999). Enfin la délétion du mésoderme présomitique entraîne l'apparition du marqueur de différenciation neuronale *Neuro M* de façon ectopique au niveau de la gouttière neurale (Diez del Corral et al., 2002). Le mésoderme présomitique est donc nécessaire au maintien du programme transcriptionnel caudal dans la plaque et la gouttière neurale. Il va de plus permettre l'activation progressive du programme transcriptionnel et de différenciation associés au tube neural.

L'effet du mésoderme présomitique sur le maintien de la plaque et la gouttière neurale dans un état immature est médié par la voie de signalisation FGF. La transduction du signal FGF peut se faire par trois voies majeures: la voie Ras/MAPK qui mène à l'activation par Phosphorylation de facteur de transcription, la voie de la PLC γ , et la voie de la PI3K (pour revue (Bottcher and Niehrs, 2005) (figure 6A) . Le gène du FGF8 est exprimé en gradient rostrocaudal décroissant dans le mésoderme présomitique (figure 7A) (Bertrand et al., 2000; Diez del Corral et al., 2002; Dubrulle and Pourquie, 2004). Le *récepteur 1 au FGF* est exprimé dans toute la structure neurale (Bertrand et al., 2000). La greffe d'une bille chargée en FGF 8 contre le tube neural maintien ou réactive l'expression de gènes caudaux comme *Sax1* ou *Cash4* et réprime l'expression du gène *Pax6* et de *NeuroM* (Bertrand et al., 2000; Diez del Corral et al., 2002). L'inhibition de la voie de transduction FGF entraîne une diminution d'expression du gène *Sax1* et une activation prématurée des gènes *Pax6* ou *Irx3* (Bertrand et al., 2000; del Corral et al., 2003). Ces résultats montrent donc que la signalisation FGF est capable de mimer l'action du PSM sur le maintien de la plaque et de la gouttière neurale dans un état jeune.

Des études de cartographie réalisées sur des embryons de poulet à partir d'un stade 6HH ont permis de montrer que le territoire à l'origine de la moelle épinière est localisé dans la région caudale de la plaque neurale au niveau du Nœud de Hensen (Brown and Storey, 2000) (Catala et al., 1996). Au cours de l'allongement antero-postérieur de l'embryon les cellules vont progressivement quitter la plaque neurale caudale pour être intégrées à la

gouttière puis au tube neural. Il a été montré qu'au stade 10 HH certaines cellules proche du Nœud de Hensen restent dans la partie caudale du neuroépithélium au cours de l'allongement de l'embryon et pourraient donc être considérées comme des «cellules souches» (Mathis, 2001 #5). La voie FGF est nécessaire au maintien d'une zone souche caudale durant la régression du nœud de Hensen (Mathis et al., 2001). En effet si l'on bloque la signalisation FGF à l'aide d'un dominant négatif du récepteur au FGF les cellules quittent prématurément la zone souche pour s'intégrer dans le tube neural engendrant des défauts d'allongement de la structure (Mathis et al., 2001).

La voie de signalisation FGF a donc pour rôle de maintenir la gouttière et la plaque neurale dans un état immature contenant une zone souche de précurseurs nécessaire au développement antéro-postérieur progressif de l'axe neural. L'atténuation de la signalisation FGF est ensuite nécessaire à la progression du programme transcriptionnel et à la différenciation dans le tube neural.

d) Rôle du mésoderme somitique et de la voie de l'acide rétinoïque dans la maturation du tube neural.

Des expériences de cultures d'explants de plaque neurale caudale ont montré que l'inhibition de la voie FGF n'est pas suffisante pour déclencher la différenciation neuronale (Diez del Corral et al., 2002). Par contre si ces mêmes explants sont co-cultivés avec du tissu somitique, on observe de la différenciation neuronale suggérant que le somite joue un rôle actif sur la maturation du tube neural. Des expériences de délétions de somites ont montré que ce tissu est nécessaire à l'expression d'*Irx3* (del Corral et al., 2003) ou à l'apparition du marqueur *Neuro M* (Diez del Corral et al., 2002). Il a aussi été montré qu'une greffe de somite face à la gouttière neurale est capable d'activer prématurément l'expression de *Pax6* (Pituello et al., 1999). Le somite joue donc un rôle actif dans la maturation du tissu neural.

L'acide rétinoïque constitue le facteur somitique impliqué dans la maturation du tube neural. L'acide rétinoïque est une molécule diffusible synthétisée à partir de la vitamine A notamment par la rétinaldéhyde deshydrogénase 2 (RALDH2). L'acide rétinoïque rentre dans le noyau où il se lie à des récepteurs (RAR et RXR) qui s'hétérodimérisent pour venir se fixer à des séquences de l'ADN (RARE) situées sur les gènes cibles et permettre leur activation (figure 6B)(Maden, 2002). Le gène *RALDH2* est exprimé dans les somites et dans la partie rostrale du mésoderme présomitique suggérant que ces sites soient les lieux de synthèse de

l'acide rétinoïque. Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont eux exprimés principalement dans le tube neural mais aussi dans la gouttière neurale (del Corral et al., 2003). L'addition d'acide rétinoïque à des cultures d'explants de plaque neurale entraîne l'apparition de cellules positives pour le marqueur *Neuro M*, comme la co-culture d'explants de plaque neurale et de somite (del Corral et al., 2003). Ces mêmes co-cultures réalisées en présence d'inhibiteur de la voie de l'acide rétinoïque montrent que cette voie est nécessaire à l'effet inducteur du somite sur la différenciation neuronale (del Corral et al., 2003). Enfin, les analyses d'embryons de cailles déficientes en vitamine A (VAD) ou d'électroporation d'une forme dominante négative du récepteur à l'acide rétinoïque montrent un retard ou une inhibition de l'expression des gènes *Pax6* ou *Irx3* (del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003).

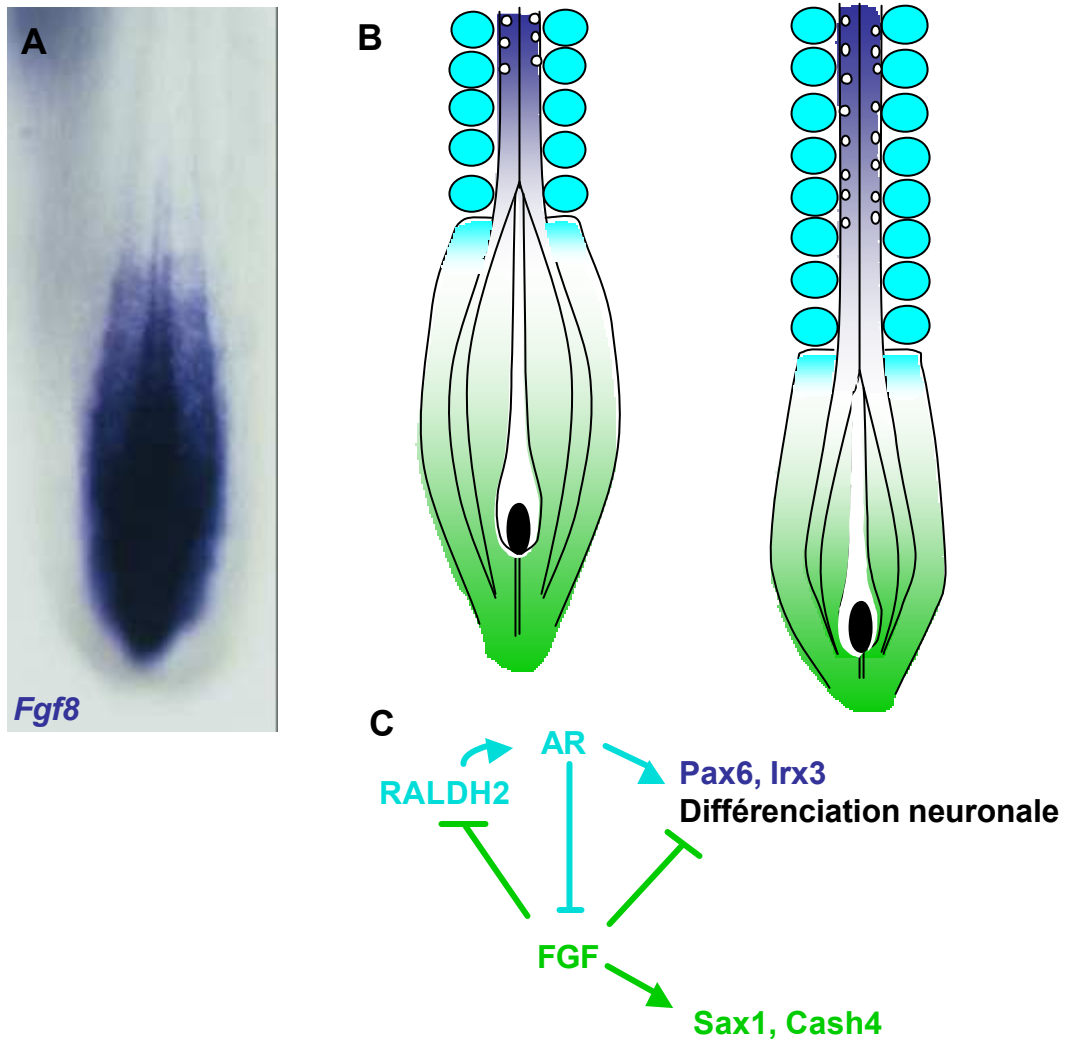


Figure 7 : Les voies du FGF et de l'acide rétinoïque contrôlent la maturation du neuroépithélium.

Le *FGF8* est exprimé dans la plaque neurale et sous forme d'un gradient caudo-rostral décroissant dans le mésoderme présomitique (A, B) (A: Hybridation *in situ* *FGF8* sur un embryon de poulet au stade HH 9-10, seule la région caudale est présentée). La signalisation FGF agit sur le neuroépithélium caudal pour maintenir l'expression du programme transcriptionnel caudal, inhiber la différenciation neuronale et maintenir une zone souche de précurseurs neuraux (C). L'atténuation de cette signalisation est nécessaire à l'activation des gènes *Pax6* et *Irx3* et à l'initiation de la différenciation neuronale par l'acide rétinoïque, synthétisé au niveau des somites et du mésoderme présomitique rostral (B, C) (les sources de l'AR sont représentées en bleu clair en B). Une régulation croisée entre les voies du FGF et de l'AR existe: le FGF réprime la synthèse de l'AR et l'AR réprime l'expression de *FGF8*. Au cours de l'allongement caudal de l'embryon, les relations entre ces deux voies de signalisation permettent la progression caudale de l'expression de *Pax6* et *Irx3* et de la différenciation neuronale (B).

e) Antagonisme des voies de signalisation FGF et acide rétinoïque.

Les actions opposées entre les voies du FGF et de l'acide rétinoïque au cours de la maturation du tissu neural s'accompagne de mécanismes d'antagonismes mutuels entre ces voies de signalisation. En effet, l'analyse des mutants de caille (VAD) montre une activation ectopique de l'expression du FGF8 dans la gouttière neurale. A l'inverse la présence d'acide rétinoïque dans des cultures d'explants de plaque neurale caudale diminue l'expression de *FGF8*. Ces données montrent que l'acide rétinoïque est nécessaire et suffisant à l'inhibition de l'expression du gène *FGF8* (del Corral et al., 2003). D'autre part, la greffe de bille de FGF8 au contact du mésoderme paraxial inhibe l'expression de la *RALDH2* suggérant que le FGF8 est capable d'inhiber la synthèse d'acide rétinoïque dans le mésoderme paraxial (del Corral et al., 2003). Il existe donc une inhibition mutuelle entre les voies de signalisation du FGF et de l'acide rétinoïque au sein du mésoderme paraxial. Cette inhibition mutuelle semble effective au niveau de la production de ces molécules signalisantes.

En résumé, le développement anteroposterieur du tissu neural est donc régi par l'antagonisme des voies de signalisation du FGF et de l'acide rétinoïque. La voie de signalisation FGF issu du mésoderme présomitique maintient les régions neurales caudales dans un état immature participant ainsi à l'allongement continu de la structure. L'inhibition de la voie FGF et l'activation de la voie de l'acide rétinoïque dans le mésoderme somitique permettent la maturation du tissu neural incluant l'activation d'un programme transcriptionnel spécifique et l'initiation de la différenciation neuronale (figure 7B,C).

Domaines de précurseurs,
zone ventriculaire

Neurones en différenciation,
zone du manteau

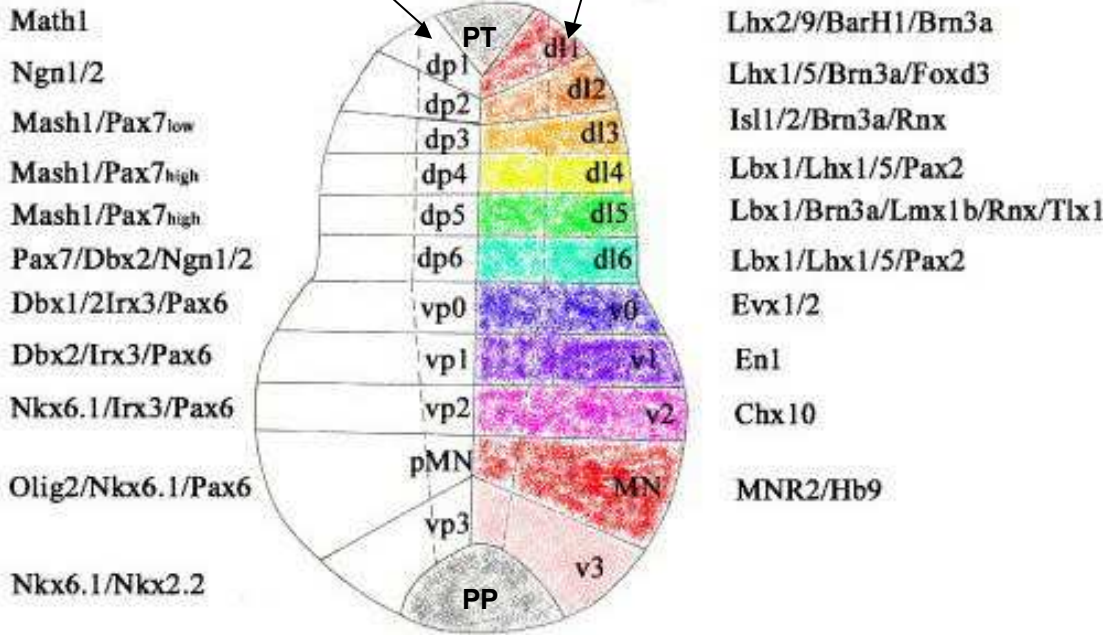


Figure 8 : Schéma montrant les six classes de neurones dorsaux (dl1 à dl6) et les 5 classes de neurones ventraux (v0 à v3 + motoneurones) dans la moelle épinière.

Sur la gauche les marqueurs moléculaires qui sont utilisés pour identifier les différents sous types de précurseurs (dans la zone ventriculaire) selon l'axe dorso-ventral. Sur la droite les différents marqueurs moléculaires utilisés pour identifier les différents types neuronaux en différenciation (dans la zone du manteau). Dans le domaine le plus dorsal se trouve la plaque du toit (PT), dans le domaine le plus ventral, la plaque du planche r (PP). (D'après Wilson et al., Dev Biol. 2005 Jun 1;282(1):1-13)

C/ Genèse des différentes populations neuronales de la moelle épinière selon l'axe dorso-ventral.

La moelle épinière est une structure qui présente une organisation régionalisée selon l'axe dorso-ventral. Les différents types de neurones qui la composent sont localisés de manière différentielle selon leurs fonctions. Ainsi les neurones moteurs et certaines classes d'interneurones sont situés dans la moitié ventrale (plaque basale) de la moelle épinière. Plusieurs populations d'interneurones sensoriels et les neurones commissuraux sont localisés dans la partie dorsale (plaque alaire). Les cellules de la crête neurale issues de la partie dorsale du tube neural vont migrer pour former entre autre le système nerveux périphérique. Aux deux extrémités de la moelle épinière en développement se trouvent des groupes de cellules qui ne vont pas générer de neurones : la plaque du toit, située dans la partie la plus dorsale et la plaque du plancher située dans la partie la plus ventrale. Beaucoup de marqueurs moléculaires ont été utilisés pour caractériser les différents sous types de neurones au sein de la moelle épinière en développement. Ces marqueurs permettent de subdiviser les neurones dorsaux en 6 groupes et les neurones ventraux en cinq groupes incluant les motoneurones. On distingue deux types de marqueurs moléculaires, ceux qui sont exprimés dans la zone ventriculaire et marquent les cellules précurseurs neurales en prolifération et ceux qui sont exprimés dans la zone du manteau où les neurones sont en cours de différenciation (figure 8) (Wilson and Maden, 2005).

a) Spécification des populations de neurones dans l'ébauche de moelle épinière.

1) Les neurones ventraux.

1.1) La corde et la plaque du plancher ont des propriétés ventralisantes sur le tube neural.

La corde est la structure mésodermique axiale située sous la région médiane du neuroépithélium. Des expériences de greffes et d'ablations ont permis de prouver que cette structure avait un rôle dans la régionalisation ventrale du neuroépithélium. Si l'on greffe une corde surnuméraire en position latérale contre la paroi du tube neural on observe la différenciation ectopique de plaque du plancher (van Straaten et al., 1985; van Straaten et al., 1988; Yamada et al., 1991). L'induction de cette plaque du plancher dans les régions dorsales et latérales du tube neural s'accompagne de la différenciation de motoneurones de part et

d'autres de la plaque du plancher induite (Ericson et al., 1992; Yamada et al., 1993). Alors que l'induction de la plaque du plancher nécessite un contact entre la corde et la plaque neurale, l'induction des motoneurones peut être indépendante de ce contact et dépend de l'activité de facteurs diffusibles (Placzek et al., 1993; Yamada et al., 1993). L'ablation de la corde conduit à l'absence de différenciation de la plaque du plancher et des motoneurones (Yamada et al., 1991). Enfin des expériences de greffe de plaque du plancher montrent que cette structure a les mêmes propriétés inductrices que la corde (Placzek et al., 1993). Ces données montrent que la corde a la capacité d'induire la plaque du plancher. A la suite de cette induction ces deux structures vont régionaliser la partie ventrale du tube neural. En ce qui concerne l'origine de la plaque du plancher, d'autres résultats montrent que la plaque du plancher n'est pas induite par la corde mais provient de l'insertion dans la plaque neurale de cellules précurseurs présentes au niveau du nœud de Hensen (Catala et al., 1996; Le Douarin and Halpern, 2000; Placzek et al., 2000). Des données acquises chez le poisson zèbre et chez le poulet, réconcilient les deux modèles en suggérant qu'une partie de la plaque du plancher (plaque du plancher primaire) aurait une origine mésodermique, et qu'une autre partie (plaque du plancher secondaire) serait elle induite à partir de cellules du neuroépithélium (Charrier et al., 2002), (Odenthal et al., 2000), (Schauerte et al., 1998).

1.2) Le morphogène Shh est responsable de la spécification des populations neurales ventrales dans le tube neural.

Le gène *Sonic Hedgehog* code pour une glycoprotéine sécrétée. Ce gène est exprimé dans la corde et la plaque du plancher en accord avec les propriétés inductrices de ces structures (Echelard et al., 1993), (Marti et al., 1995b). Des expériences de gain de fonction ont permis de montrer que la protéine Shh est capable de mimer les propriétés inductrices de la corde et de la plaque du plancher sur le tube neural (Echelard et al., 1993), (Marti et al., 1995a), (Roelink et al., 1994; Roelink et al., 1995; Ruiz i Altaba et al., 1995; Tanabe et al., 1995). De plus, l'analyse des souris mutantes pour le gène *Shh* et l'utilisation d'anticorps bloquants ont montré que le produit de ce gène est essentiel à l'induction des cellules de la plaque du plancher et des motoneurones. (Chiang et al., 1996; Ericson et al., 1996; Marti et al., 1995a). Ces données montrent que la protéine Shh est le support moléculaire des activités ventralisantes de la corde et de la plaque du plancher.

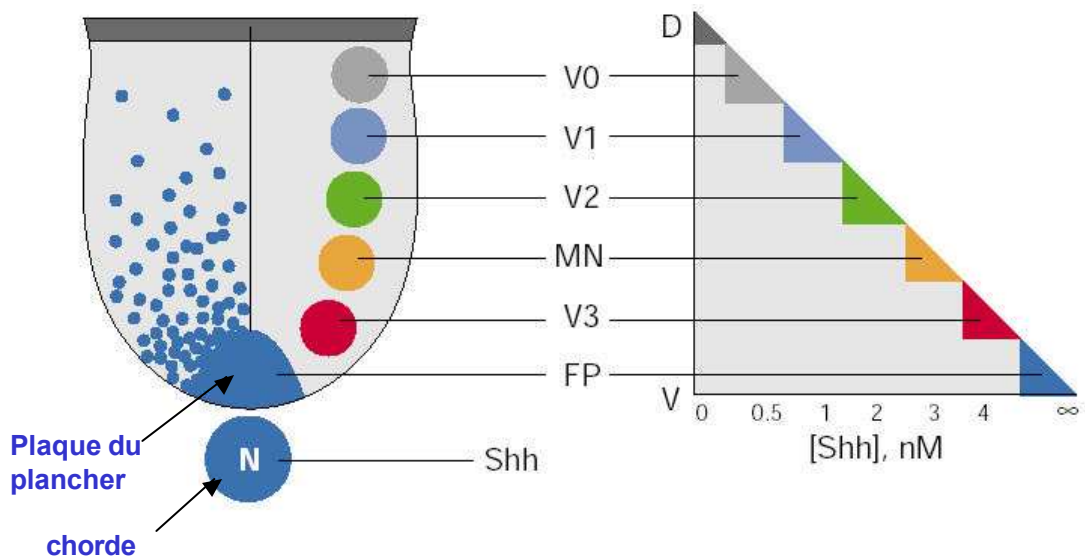


Figure 9 : SHH agit comme un morphogène dans la partie ventrale du tube neural.

SHH est produit par la chorde puis par la plaque du plancher et diffuse dans le tube neural. Il s'établit ainsi un gradient de concentration du facteur dans le tube neural. SHH peut induire de façon dose-dépendante la différenciation de toutes les populations ventrales de neurones de la moelle épinière *in vitro*. Il existe une corrélation entre la position D-V occupée par les précurseurs d'une population de neurones donnée et la dose de SHH requise pour induire la différenciation de cette même population. (D'après Jacob et Briscoe, 2003)

La molécule Shh est capable d'induire *in vitro* la différenciation des populations de neurones ventraux d'une manière concentration dépendante : les plus fortes doses de Shh induisent la différenciation des cellules de la plaque du plancher, puis des doses décroissantes permettent respectivement la différenciation des interneurons V3, des motoneurons et des interneurons V2, V1, V0. (Ericson et al., 1997), (Marti et al., 1995a) (Roelink et al., 1995; Tanabe et al., 1995). Les doses de protéines nécessaires à la différenciation des populations de neurones ventraux sont en corrélation avec leur position par rapport à la source de Shh. Un gradient de protéine Shh pourrait donc agir dans le tube neural pour induire de façon dose dépendante les différents sous types neuronaux ventraux (figure 9) (Briscoe and Ericson, 2001). Même si l'existence d'un tel gradient de protéine n'a jamais été directement démontré, certaines données sont en faveur de ce modèle. Ainsi le gène qui code pour le récepteur à Shh *Patched (Ptc)* (voir § suivant), qui est aussi une cible transcriptionnelle de la signalisation, est exprimé en gradient dorso-ventral décroissant à distance des sources de Shh dans le tube neural (Marigo and Tabin, 1996). De plus, l'électroporation dans le tube neural d'une forme de *Ptc* qui ne transmet pas le signal Shh dans des cellules se trouvant à distance de la source de Shh induit ces dernières dans un destin plus dorsal suggérant là aussi la nécessité d'une action de Shh à distance des cellules qui le produisent (Briscoe et al., 2001).

Dans les souris mutantes pour *Shh* les populations de neurones V0 et V1 sont encore présentes indiquant que la genèse de ces populations n'est pas totalement dépendante de la voie de signalisation Shh (Chiang et al., 1996; Litingtung and Chiang, 2000). Ces données suggèrent que d'autres protéines de la famille Hedgehog, ou que d'autres voies de signalisation pourraient participer à la spécification de ces populations de neurones. Il a en effet été montré que la signalisation de l'acide rétinoïque intervient dans les mécanismes de spécification des interneurons V0 et V1 (Pierani et al., 1999; Wilson et al., 2004).

1.3) Transduction du signal Shh et régionalisation du tube neural ventral

Chez les vertébrés il existe 3 orthologues du gène de polarité segmentaire *Hedgehog* de drosophile: *Desert Hedgehog*, *Indian Hedgehog* et *Sonic Hedgehog*. Ces gènes codent pour des facteurs sécrétés diffusibles. La protéine Sonic hedgehog est initialement synthétisée sous forme d'un précurseur qui subit par la suite un clivage autoprotéolytique catalysé par la partie C-terminale de la protéine. Le ligand actif Sonic Hedgehog est un peptide de 19 kd correspondant à la partie N-terminale issue de l'autoclivage (Marti et al., 1995a; Roelink et al., 1995). Le peptide subit *in vivo* deux modifications : l'ajout d'un groupement cholestérol

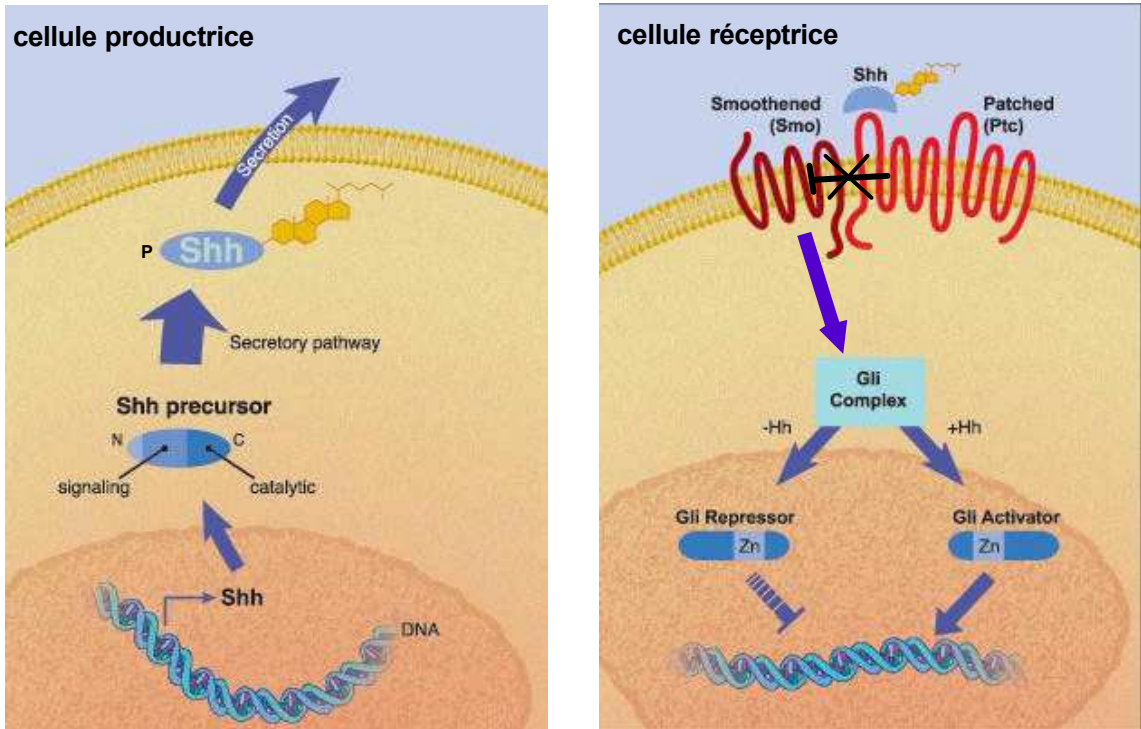


Figure 10 : Représentation simplifiée de la signalisation de Shh .

Dans la cellule productrice, le clivage de Shh produit le peptide actif N-Shh. A ce peptide sont ajoutés un groupement cholestérol en C-terminal et un groupement palmitoyl (P) en N-terminal. Au niveau de la cellule réceptrice, en l'absence de N-Shh, Patched inhibe l'activité de Smoothened. En présence de N-Shh, Patched lève son inhibition sur Smoothened, et la transduction du signal est activée. Cette transduction du signal passe par un complexe comprenant les facteurs de transcription Glis (Gli1 à Gli3) qui vont inhiber ou activer les gènes cibles de la voie. (Schéma modifié d'après le site web R et D system)

en partie C-terminale et l'ajout d'un groupement palmitoyl en partie N-terminale. Ces modifications ont des influences dans l'activité et la diffusion des protéines Hedgehog (Chamoun et al., 2001; Lewis et al., 2001).

Beaucoup d'éléments de la voie de transduction Sonic hedgehog ont initialement été identifiés par des études menées chez la drosophile. Le récepteur connu au ligand Hedgehog est la molécule à 7 domaines transmembranaires Patched (Ptc). En absence de ligand Ptc inhibe une autre protéine transmembranaire Smoothened (Smo) et empêche ainsi la transduction du signal. Dans ce cas le facteur de transcription à doigts de zinc Ci (Cubitus interruptus) est modifié par clivage protéique en une forme répresseur de transcription et peut inhiber les cibles de la voie de signalisation. En présence de Hedgehog, il y a levée d'inhibition de Ptc sur Smoothened entraînant la transduction de la voie de signalisation ; cette cascade de transduction qui fait intervenir la protéine kinase A conduit à la nucléarisation du facteur de transcription Ci sous sa forme activatrice et conduit donc à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie (pour revue voir (Hooper and Scott, 2005))(figure 10).

La signalisation Sonic Hedgehog (Vertébrés) a beaucoup de caractéristiques communes avec la signalisation Hedgehog de drosophile. Les orthologues de *Patched* et de *Smoothened* ont été identifiés chez les vertébrés et la fonction de ces gènes est essentielle pour médier la fonction de Shh (Hynes et al., 2000; Wijgerde et al., 2002). Le gène *Patched* est exprimé selon un gradient ventro dorsal décroissant dans le tube neural. L'inactivation de ce gène chez la souris entraîne l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation Shh dans tout le tube neural confortant l'analogie de fonction par dérégulation avec l'orthologue de drosophile (Goodrich et al., 1997). Chez les Vertébrés, il existe 3 gènes de type *Gli* codant pour des facteurs de transcription orthologues de *Ci*. *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* sont tous les trois exprimés dans la zone ventriculaire du tube neural. *Gli1* est exprimé préférentiellement dans la partie ventrale du tube neural, *Gli2* est exprimé plus uniformément avec un renforcement en partie intermédiaire et dorsale et *Gli3* est plutôt exprimé en partie dorsale.

L'expression et la fonction de ces protéines sont différenciellement régulées par la voie de signalisation Shh, de plus les différentes protéines Glis ont des fonctions distinctes.

La voie de signalisation Shh régule positivement l'expression de *Gli1* (Lee et al., 1997; Marigo et al., 1996; Ruiz i Altaba, 1998). La protéine Gli1 n'est pas clivée et agit comme un activateur de transcription (Dai et al., 1999). Des expériences de gain de fonction menées chez le xénope ou la souris montrent que *Gli1* est capable d'induire des cibles de la voie de signalisation Shh (Hynes et al., 1997; Lee et al., 1997; Ruiz i Altaba, 1998; Ruiz i

Altaba, 1999). Bien que *Gli1* soit capable de mimer les effets de Shh sur la spécification des populations ventrales de la moelle épinière, les souris invalidées pour le gène *Gli1* n'ont pas de phénotype apparent (Bai et al., 2002; Park et al., 2000).

Chez le xénope l'expression du gène *Gli2* est induite par Shh (Ruiz i Altaba, 1998). Contrairement à *Gli1*, et comme *Ci*, des formes clivées de *Gli2* et *Gli3* peuvent former des protéines activatrices (région C-terminale) ou inhibitrices (région N-terminale) de la transcription (Aza-Blanc et al., 2000; Dai et al., 1999; Ruiz i Altaba, 1999; Sasaki et al., 1999). Les souris invalidées pour le gène *Gli2* présentent un défaut de formation de la plaque du plancher et des interneurons V3 montrant que la fonction de ce gène est impliquée dans la formation des structures les plus ventrales du tube neural (Ding et al., 1998; Matise et al., 1998). Le phénotype des souris mutantes pour *Gli2* peut être sauvé par introduction du gène *Gli1* dans le locus *Gli2* suggérant que *Gli2* agit comme un activateur de la transcription dans le tube neural (Bai and Joyner, 2001).

La signalisation Shh réprime l'expression de *Gli3* (Ruiz i Altaba, 1998) et inhibe la formation de la forme répresseur de la protéine (Aza-Blanc et al., 2000; Wang et al., 2000). Chez la souris, l'absence de *Gli3* provoque des défauts de formation dans les parties intermédiaire et dorsale du tube neural (Franz, 1994; Persson et al., 2002; Theil et al., 1999). De manière intéressante et en accord avec l'activité inhibitrice de *Gli3*, la perte des populations ventrales du mutant *Shh* *-/-* est partiellement sauvée dans les double mutant *Shh* *-/-* *Gli3* *-/-* (Litingtung and Chiang, 2000). D'autre part il a aussi été montré que *Gli3* a une fonction activatrice sur la voie Shh dans le tube neural, ainsi l'activité de la voie est diminuée dans les souris mutantes pour *Gli3* (Bai et al., 2004; Lei et al., 2004).

L'absence d'expression de *Gli1*, cible transcriptionnelle de la signalisation Shh, dans les doubles mutants *Gli2* *-/-*, *Gli3* *-/-*, montre que la transcription de *Gli1* est dépendante de la fonction de ces deux gènes. Le phénotype de ces mutants qui n'ont plus aucune fonction Gli est le même que celui des doubles mutants *Shh* *-/-*, *Gli3* *-/-* ou *Smo* *-/-* *Gli3* *-/-*, montrant que l'activité Shh dépend des protéines Glis dans le tube neural (Bai et al., 2004; Lei et al., 2004; Litingtung and Chiang, 2000; Wijgerde et al., 2002).

Ces données ont permis de proposer que le gradient de Shh induit une combinatoire de protéines Glis à fonction activatrice (*Gli1*, *Gli2*, *Gli3*) et répressive (*Gli3*) qui va permettre la régionalisation du tube neural ((Nguyen et al., 2005; Ruiz i Altaba, 1998), pour revues (Ruiz i Altaba, 1997; Ruiz i Altaba et al., 2003) (Jacob and Briscoe, 2003)). En accord avec ce modèle, il a récemment été établi qu'un gradient d'activité Gli va effectivement permettre la régionalisation du tube neural ventral (Stamatakis et al., 2005). Des expériences de gain de

fonction des formes activatrices de Gli2 et Gli3 dans le tube neural de poulet suggèrent que ces protéines pourraient jouer un rôle important dans la prolifération des progéniteurs neuraux et dans leur ségrégation en pools distincts (Lei et al., 2004). De manière surprenante, des motoneurones et trois types d'interneurones ventraux sont présents des embryons *Gli2* *-/-* ; *Gli3* *-/-*. La ségrégation des pools de progéniteurs correspondant à ces neurones est fortement altérée dans ces mutants, ces données suggèrent toutefois qu'une partie de la genèse de ces précurseurs neuraux ventraux est indépendante de la fonction des protéines Glis chez la souris (Bai et al., 2004; Lei et al., 2004).

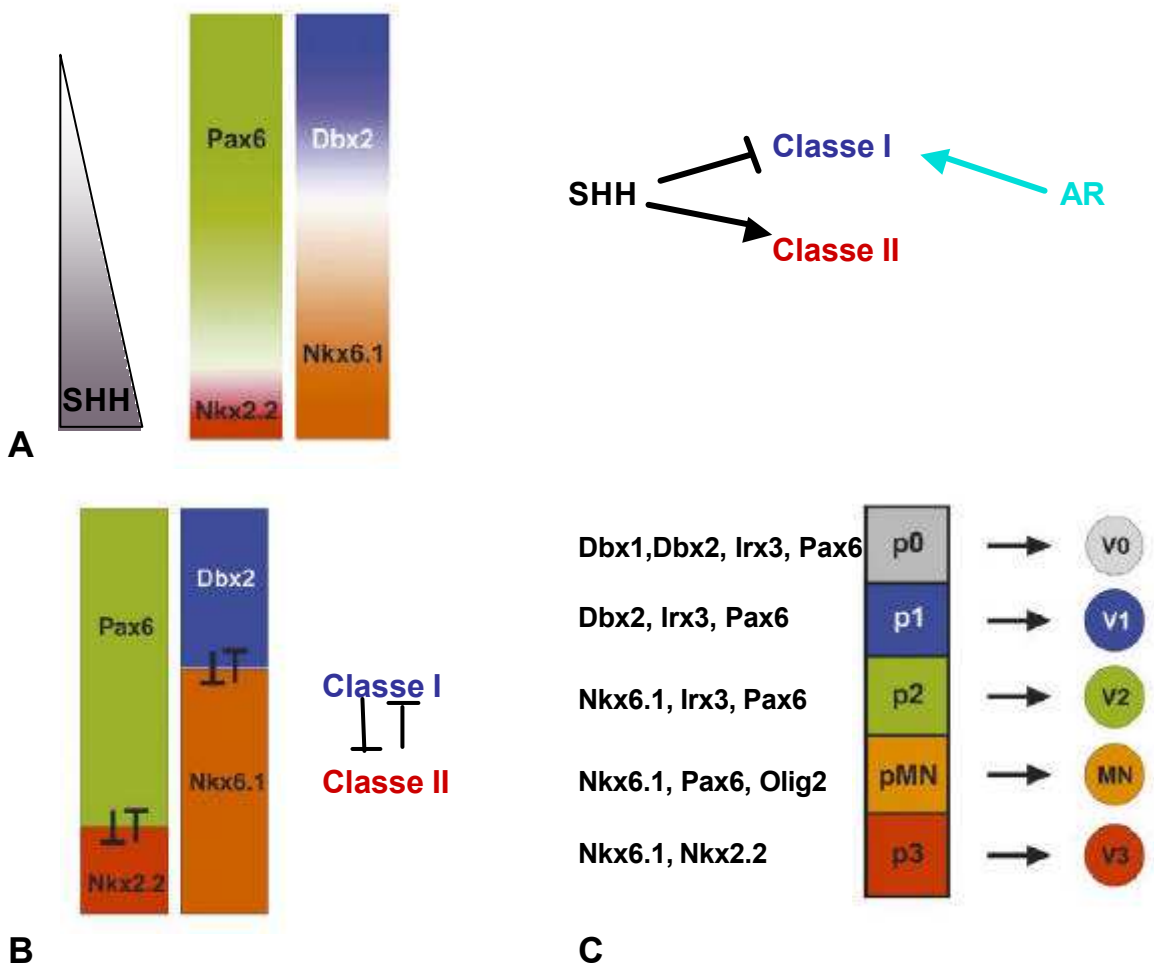


Figure 11 : Établissement des différents domaines de précurseurs neuraux dans la partie ventrale du tube neural par une combinatoire de facteur de transcription.

A) Le gradient SHH va induire l'expression de facteurs de transcription de classe II comme Nkx2.2 ou Nkx6.1 et réprimer l'expression de facteur de classe I comme Pax6 ou Dbx2. L'acide rétinoïque va activer l'expression de gène de classe I ; B) Les gènes de classe I et II vont inhiber mutuellement leur expression de manière à stabiliser leur frontière d'expression respective. C) Une combinatoire d'expression des facteurs de transcription de classe I et II définit les différents domaines de précurseurs neuraux qui vont donner naissance à chaque sous types neuronaux ventraux. (D'après Price and Briscoe, 2004)

1.4) Mise en place des différents domaines de précurseurs neuraux ventraux.

Plusieurs protéines à homéodomains sont exprimées dans la moitié ventrale du tube neural et leur combinatoire d'expression permet de subdiviser la moitié ventrale du tube neural en cinq domaines de précurseurs neuraux (figure 11C). Pour établir son action sur la spécification des précurseurs neuraux, la voie de signalisation Shh (via les protéines Glis) est capable de réprimer l'expression d'un groupe de ces facteurs de transcription alors qu'elle va activer l'expression d'un autre groupe. Les gènes réprimés par Shh sont dits de classe I : il s'agit de *Pax7*, *Dbx1*, *Dbx2*, *Irx3* et *Pax6*, et les gènes activés par Shh sont dits de classe II : il s'agit de *Nkx6.1*, *Olig2*, *Nkx2.2*, et *Nkx2.9*. (figure 11A) ((Briscoe et al., 2000; Briscoe et al., 1999), (Ericson et al., 1997; Ericson et al., 1996), (Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001; Pierani et al., 1999). Nous avons vu précédemment que l'initiation de l'expression des facteurs de classe I, *Pax6* ou *Irx3*, est régulée par l'antagonisme des voies de l'acide rétinoïque et du FGF. Le FGF exerce une forte activité répressive sur les gènes de classe I et une faible activité répressive sur les gènes de classe II. Enfin, il a été montré que l'expression du gène *Olig 2* est aussi sous la dépendance de la voie de l'acide rétinoïque (Diez del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003).

Des interactions croisées existent entre les voies de signalisation qui régulent l'expression de ces facteurs de transcription. La voie de signalisation FGF inhibe celle de l'acide rétinoïque et inhibe aussi l'expression de Shh (Diez del Corral et al., 2003). Enfin il a récemment été montré que le domaine d'expression de *Shh* s'étend dans les embryons de cailles déficientes en Vitamine A (Wilson et al., 2004). La voie de l'acide rétinoïque régule donc négativement la signalisation Shh.

L'ensemble de ces données montre qu'au niveau du tube neural l'atténuation de la voie FGF va permettre l'activation de la voie de signalisation Shh et de la voie de l'acide rétinoïque. La voie de signalisation Shh va activer l'expression des gènes de classe II dans la partie la plus ventrale du tube neural alors qu'elle va réprimer l'expression des gènes de classe I. La voie de l'acide rétinoïque va elle activer l'expression des gènes de classe I et d'*Olig2* (figure 11A).

La limite d'expression ventrale de chacun des gènes de classes I correspond à la limite d'expression dorsale d'un gène de classe II (Briscoe et al., 2000). Des études de gain et perte de fonction ont montré qu'il existe des inhibitions croisées entre couples de gènes de classe I et II. Par exemple, l'expression ectopique ventrale de *Pax6* éteint l'expression de *Nkx2.2* et

inversement l'expression ectopique dorsale de *Nkx2.2* éteint l'expression de *Pax6* (figure 11B). Ces inhibitions croisées établissent avec précision les limites d'expression de ces facteurs de transcription dans les domaines de précurseurs qui vont générer les différents types de neurones. Le modèle proposé est donc que la combinatoire d'expression de facteurs de transcription de classe I et II confère une identité aux 5 domaines de précurseurs neuraux ventraux (pour revue voir (Briscoe and Ericson, 2001)). Ces domaines de précurseurs donnent naissance aux 5 types de neurones ventraux de la moelle épinière (figure 11C). Ce modèle a été confirmé par des analyses de perte et de gain de fonction (pour revue voir (Lee and Pfaff, 2001)).

2) Les neurones dorsaux.

Les populations neurales présentes dans la partie dorsale de la moelle sont divisées en six groupes d'interneurones sensoriels (dl1 à dl6), caractérisés par l'expression de facteurs de transcription à homéodomaines de type LIM ou à domaine bHLH (Wilson and Maden, 2005) (figure 8).

L'ectoderme non neural dorsal au contact de la plaque neurale est capable d'engager les cellules de cette dernière vers un destin dorsal. Des explants de plaque neurale intermédiaire cultivés en présence d'ectoderme non neural se différencient en cellules de la crête neurale et en cellules de la plaque du toit (Liem et al., 1997; Liem et al., 1995). Cet effet inducteur est médié par les molécules signalisantes BMP4 et BMP7 synthétisées par l'ectoderme non neural. En effet, il a été montré que ces molécules sont capables de mimer l'effet inducteur de l'ectoderme non neural sur des explants de plaque neurale. De plus, l'utilisation d'antagonistes des BMPs comme Noggin ou la Follistatine inhibe l'action dorsalisante de l'ectoderme non neural (Liem et al., 1997; Liem et al., 1995).

Par la suite, la plaque du toit induite par l'ectoderme non neural va avoir des propriétés inductrices sur la mise en place des populations d'interneurones dorsaux. La culture d'explants de plaque neurale en présence de plaque du toit induit la différenciation d'interneurones les plus dorsaux (Liem et al., 1997). De plus dans des souris ayant subi l'ablation génétique de la plaque du toit, les interneurones dl1 et dl2 ne se différencient pas et on constate une augmentation de la population dl3 (Lee et al., 2000). La plaque du toit exprime BMP4, BMP5, BMP7 et d'autres protéines de type TGF β . Les protéines BMP4, BMP5, BMP7 sont capables de réguler l'expression de facteurs de transcription exprimés par les précurseurs neuraux dorsaux comme *Pax3* ou *Msx* et ainsi d'induire la différenciation de

sous types de neurones dorsaux (Liem et al., 1997; Liem et al., 1995). Des données suggèrent que comme pour le morphogène Shh dans la partie ventrale du tube neural, l'action des BMP sur la spécification des neurones dorsaux se fasse de manière dépendante de la concentration. Ainsi, différents niveaux d'expression d'une forme constitutivement active des récepteurs aux BMPs dans le tube neural de poulet entraîne des réponses cellulaires différentes. Des expansions et des inhibitions différentielles de l'expression des facteurs de transcription *Pax6*, *Dbx2* et *Msx1* impliqués dans la spécification des précurseurs des interneurons dorsaux sont observées en fonction du niveau de surexpression utilisé (Timmer et al., 2002).

D'autres signaux extra cellulaires émanant de la plaque du toit, *Wnt1* et *Wnt3a*, sont impliqués dans la spécification des neurones dorsaux de la moelle épinière. En effet, les embryons de souris invalidés pour les gènes *Wnt1* et *Wnt3a* sont dépourvus de neurones sensoriels de type dl 1 et dl 2 et ont un excès de neurones de type dl3, même si la présence de la plaque du toit et l'expression de BMPs est complètement normale dans ces embryons (Muroyama et al., 2002). Dans les embryons de souris double mutants pour les récepteurs 1 aux BMPs, les gènes *Wnt1* et *Wnt3a* sont moins exprimés montrant que les BMPs agissent en amont de *Wnt1* et *Wnt3a* dans la plaque du toit (Wine-Lee et al., 2004).

Ces données montrent que la signalisation BMP issue de l'ectoderme non neural permet la genèse des cellules de la crête neurale et des cellules de la plaque du toit dans la partie dorsale du tube neural. La plaque du toit permet ensuite la genèse des populations d'interneurones dorsaux par les signalisations BMP et Wnt. Le gradient de signalisation BMP va notamment contrôler les domaines d'expression des facteurs de transcription à homéodomaines de type LIM ou à domaine bHLH qui vont permettre la spécification des différentes populations d'interneurones de la partie dorsale tube neural.

b) De la spécification à la différenciation neuronale.

Les précurseurs neuraux en prolifération au niveau de la zone ventriculaire expriment une combinatoire de facteurs de transcription qui leur confère un destin neuronal. Lorsqu'un précurseur s'engage dans le processus de différenciation, il quitte le cycle cellulaire, migre latéralement pour venir se localiser au niveau de la zone sous ventriculaire puis dans la zone du manteau (figure 5). La transition entre un précurseur neural en prolifération et un neurone différencié implique la coordination des phénomènes de spécification, sortie du cycle cellulaire et différenciation.

La spécification des neurones à partir des différents domaines de précurseurs neuraux se fait par inhibition de destins alternatifs. Ce phénomène a été particulièrement étudié pour les motoneurones où la plupart des facteurs de transcription impliqués dans la spécification fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels (Lee and Pfaff, 2001). Dans le domaine des précurseurs des motoneurones, les facteurs de transcription Nkx6 et Pax6 répriment l'expression de gènes capables d'inhiber celle du gène *Olig2*. L'expression d'*Olig2* est donc spécifiquement dérèprimée dans le domaine des motoneurones. *Olig2* va par la suite permettre l'expression de facteurs de transcription à homédomaine impliqués dans les processus de différenciation des motoneurones comme *Mnr2*, *Lim3* ou *HB9* dans la zone sous ventriculaire (Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001).

La spécification des sous populations neuronales doit être intégrée, au niveau des précurseurs neuraux avec les mécanismes généraux de neurogenèse. La mise en place d'un programme neurogénique dans les précurseurs neuraux implique les gènes proneuraux qui codent pour des facteurs de transcription à domaine bHLH et vont réguler la sortie du cycle cellulaire puis la différenciation neuronale. Les gènes proneuraux sont initialement exprimés dans des groupes de cellules équivalentes. Ces gènes vont induire le phénomène d'inhibition latérale qui va restreindre leur expression à une seule cellule. Cette cellule va alors s'engager dans la différenciation neuronale. Pour engager cette cellule dans un destin neuronal différencié les gènes proneuraux vont exercer entre autres deux autres fonctions : ils favorisent l'arrêt du cycle cellulaire en activant des inhibiteurs de CDK (CKI) (voir § II b) et ils vont promouvoir l'expression de facteurs généraux de différenciation comme par exemple les gènes *Neuro D* ou *Neuro M* qui sont exprimés au niveau de la zone sous ventriculaire de la moelle épinière (pour revue voir (Bertrand et al., 2002)). Ainsi les gènes codant pour les *Neurogénines* ont été identifiés comme ayant des fonctions proneurales dans la moelle épinière de Vertébrés. Ces gènes présentent des domaines d'expression distincts et régionalisés selon l'axe dorso-ventral. L'analyse des souris déficientes pour la fonction de ces gènes montre des défauts sévères dans différentes régions du système nerveux. En particulier une large partie des neurones ventraux est absente dans le double mutant *Ngn1*^{-/-}, *Ngn2*^{-/-} (Scardigli et al., 2001). De plus, des expériences de gain de fonctions ont mis en évidence que ces gènes sont suffisants pour induire la différenciation neuronale (Ma et al., 1996) (Bertrand et al., 2002). Des données suggèrent que *Ngn2* aurait un rôle dans la spécification des motoneurones. En effet l'expression ectopique d'*Olig2* et *Ngn2* permet l'induction de nombreux motoneurones en position ectopique. Cet effet est spécifique de *Ngn2* puisque la coelectroporation d'*Olig2* avec un autre gène proneural ne produit pas ce phénotype

(Mizuguchi et al., 2001). Olig2 induit l'expression de *Ngn2* et réprime l'expression de gènes de différenciation comme HB9 au niveau de la zone ventriculaire. Ngn2 va par la suite agir en opposition à Olig2 dans la zone sous ventriculaire pour activer les gènes de différenciation motoneuronale et permettre aux progéniteurs neuraux de se différencier (Lee et al., 2005; Novitch et al., 2001).

En résumé, les cellules précurseurs de la zone ventriculaire sont sélectionnés par la fonction des gènes proneuraux et le processus d'inhibition latérale. Les précurseurs migrent latéralement et vont se différencier dans la zone du manteau (figure 5). La combinatoire de facteurs de transcription qui confère l'identité des précurseurs neuraux va induire une cascade de facteur de transcription spécifique permettant la différenciation de chaque sous population de neurones.

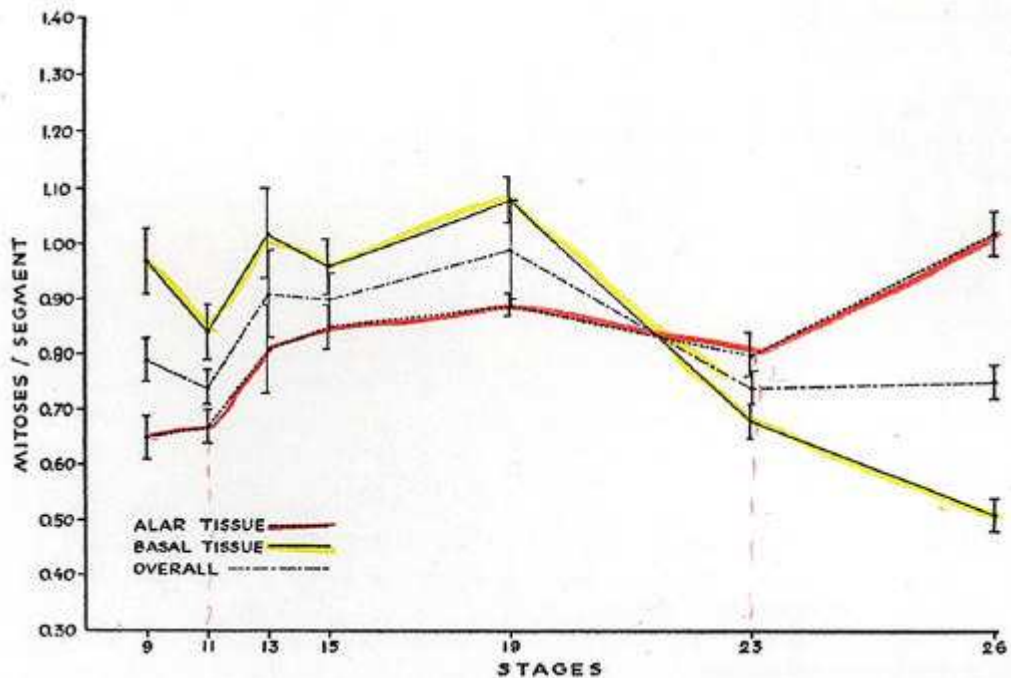


Figure 12 : Densité mitotique dans le tube neural au cours du développement de la moelle épinière.

La densité mitotique (nombre de mitoses par unité d'aire) est reportée sur l'axe des ordonnées. Les stades (HH) d'analyse sont reportés sur l'axe des abscisses. La courbe rouge représente la densité mitotique dans la partie ventrale de la moelle épinière en fonction du stade d'analyse. La courbe jaune représente la densité mitotique dans la partie dorsale de la moelle épinière en fonction du stade d'analyse. La courbe noire représente la moyenne des deux autres courbes. La densité mitotique est plus importante dans la partie ventrale par rapport à la partie dorsale du tube neural à des stades plus jeunes que le stade 20 alors que ces rapports s'inversent à des stades plus âgés. (D'après Corliss, 1963.)

D/ Contrôle de la prolifération pendant le développement de la moelle épinière.

a) Paramètres de la prolifération dans le tube neural.

Dans le tube neural les cellules n'ont pas toutes les mêmes propriétés de prolifération. Les cellules qui composent les centres organisateurs (plaque du toit et plaque du plancher) présentent une faible activité proliférative alors que les cellules neuroépithéliales qui vont donner naissance aux neurones différenciés se divisent activement. Des études de traitements par des molécules bloquant le cycle cellulaire ou des expériences d'incorporation de Thymidine tritiée ont permis de faire des estimations de la durée du cycle cellulaire dans les cellules épithéliales du tube neural de poulet. Cette durée a été estimée entre 6.3 et 8 heures (Smith and Schoenwolf, 1987) (Langman et al., 1966). Des études suggèrent que les propriétés prolifératives des cellules du neuroépithélium ne sont pas équivalentes selon l'axe dorso-ventral. En effet il a été montré que la densité mitotique, c'est à dire le nombre de figures de mitoses observées par unité d'aire, varie selon l'axe dorso-ventral. A des stades précoces de développement (stade 9, 11, 13,15 HH) la densité mitotique est en moyenne plus importante dans la plaque basale (partie ventrale) que dans la plaque alaire (partie dorsale). De manière intéressante, il semble que cette augmentation de densité mitotique soit corrélée avec le moment de genèse des motoneurones. A des stades plus tardifs de développement (stade 23,26 HH), c'est au contraire la plaque alaire qui va présenter une densité mitotique plus élevée. Cette augmentation de mitoses peut être corrélée avec le développement des interneurones et des neurones sensoriels (Corliss and Robertson, 1963; Hollyday, 2001) (figure 12). Il est cependant impossible de savoir si les différences de densité mitotique observées sont dues à des différences de durée de cycle, des différences de proportion de cellules dans le cycle, ou à des différences de durée de phase M. D'autres études basées sur des incorporation de BrdU révèlent l'existence d'un gradient de prolifération dorso-ventral décroissant dans le tube neural à des stades tardifs (stade 21, 25 HH) alors que les auteurs ne détectent pas de différence de prolifération selon l'axe dorso-ventral du tube neural à des stades jeunes (Megason and McMahon, 2002). Ces données reflètent l'existence de différences du comportement des cellules dans le cycle cellulaire entre la partie ventrale et la partie dorsale du tube neural.

b) Contrôle de la prolifération dans le tube neural dorsal.

La voie de signalisation Wnt β -caténine a été impliquée dans le processus de prolifération des précurseurs neuraux dans la partie dorsale du tube neural. *Wnt 1* et *Wnt 3a* sont exprimés au niveau de la plaque du toit et il a été montré qu'ils ont une action mitogène sur les précurseurs neuraux. De plus, la surexpression d'une forme constitutivement active de la β -caténine entraîne aussi une surcroissance du tube neural sans changement drastique de sa régionalisation. La voie de signalisation Wnt β -caténine contrôle aussi l'expression de régulateurs de la phase G1/S les *Cyclines D1* et *D2* ce qui suggère que l'action proliférative de cette voie de transduction pourrait passer au moins en partie par l'activation de ces régulateurs positifs du cycle cellulaire. Il semble donc qu'un gradient d'activité Wnt β -caténine organise la croissance du tube neural au moins dans sa partie dorsale (Megason and McMahon, 2002). Des données récentes montrent que la signalisation BMP agit en aval des ligands Wnt et de leurs récepteurs pour coordonner la régionalisation et la croissance afin de générer les populations neuronales dorsales en proportions appropriées (Chesnutt et al., 2004).

c) Contrôle de la prolifération dans le tube neural ventral.

Dans la partie ventrale du tube neural la corde semble avoir une influence sur la prolifération des précurseurs neuraux. En effet, des expériences de greffes de corde effectuées chez le poulet ont permis de mettre en évidence qu'en plus de ses propriétés de régionalisation la corde agit aussi sur la prolifération du tube neural ventral. De manière intéressante, alors qu'une greffe de corde à proximité tube neural induit l'apparition d'une plaque du plancher en position ectopique et la réduction de la prolifération, la même greffe de corde effectuée à une plus grande distance du tube neural induit la spécification de motoneurones et une prolifération accrue des précurseurs neuraux (van Straaten et al., 1985; van Straaten et al., 1988; Wilson and Maden, 2005). Le support moléculaire de cette action pourrait être la molécule Shh qui comme nous l'avons vu précédemment est exprimée dans la corde et peut induire des réponses cellulaires différentes selon sa dose. La voie de signalisation Shh a effectivement été impliquée dans la prolifération des précurseurs neuraux du tube neural. L'étude d'embryon de souris qui expriment *Shh* de manière ectopique dans la partie dorsale du tube neural montre une hyper-croissance avec des précurseurs neuraux qui ont des taux de prolifération deux fois plus importants que ceux mesurés dans des embryons sauvages (Rowitch et al., 1999). D'autre part l'activation de la voie de signalisation par un

dominant négatif de la protéine kinase A dans la partie dorsale du tube neural ou par une forme activée de Gli2 entraîne aussi un phénotype d'hyper-croissance (Epstein et al., 1996; Lei et al., 2004). De manière étonnante il a aussi été remarqué une augmentation de la prolifération dans le tube neural des embryons de souris mutants pour les gènes Gli2 et Gli3 (Bai et al., 2004). Enfin, une étude récente montre que des embryons ne pouvant pas exercer de contrôle rétro négatif de la voie Shh présente une croissance accrue de la partie ventrale du tube neural (Jeong and McMahon, 2005).

Il existe donc des différences en terme de prolifération entre le tube neural dorsal et le tube neural ventral. Le tube neural ventral semble proliférer de manière plus importante pendant le développement précoce alors que le tube neural dorsal va proliférer plus activement dans des phases plus tardives du développement. La voie de signalisation Wnt β -caténine régule l'expression de *Cyclines D* et agit positivement sur la prolifération du tube neural dorsal. La voie de signalisation Shh semble être impliquée dans la prolifération du tube neural ventral. Les mécanismes selon lesquels Shh agit sur cette prolifération ne sont pas connus.

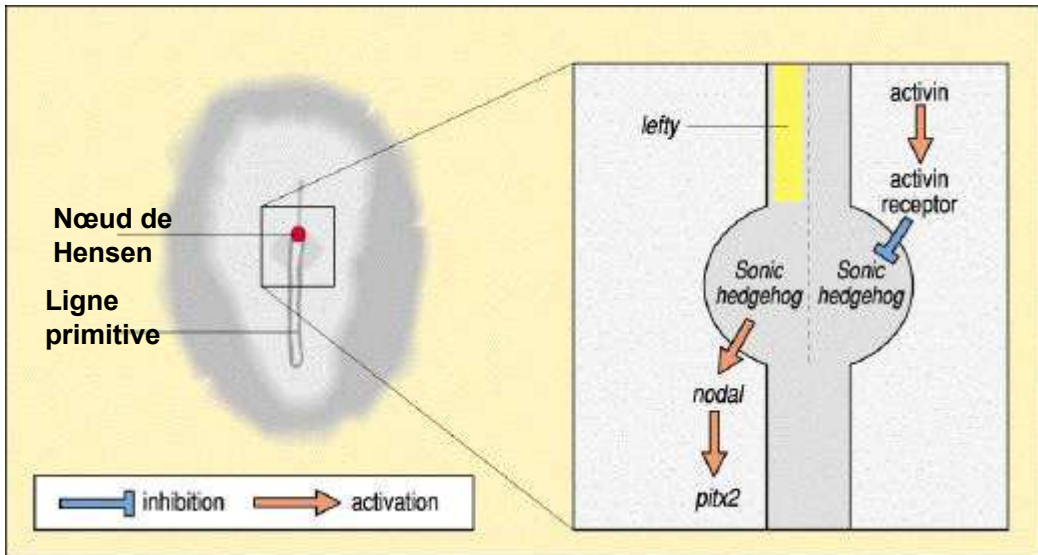


Figure 13 : Représentation simplifiée de la cascade moléculaire impliquée dans la mise en place de l'asymétrie gauche / droite chez l'embryon de poulet stade 4HH.

L'activation du récepteur à l'activine pourrait réprimer l'expression de Sonic Hedgehog du côté droit du nœud de Hensen; Sonic Hedgehog est alors exprimé spécifiquement à gauche du Nœud. Sonic Hedgehog induit l'expression de Nodal et d'une cascade moléculaire responsable de la mise en place gauche/droite invariable des organes au sein de l'individu. L'expression du gène *Lefty* constitue une barrière à la diffusion des signaux diffusible d'un côté à l'autre. (D'après *Principles of development*, second edition, Lewis Wolpert)

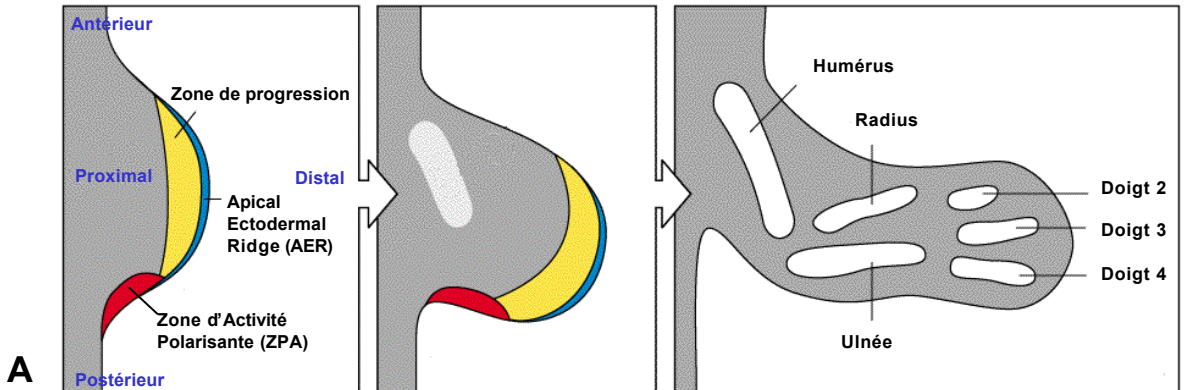
II/ La voie de signalisation Shh dans le développement et le contrôle de la prolifération cellulaire.

A/ Signalisation Shh et développement.

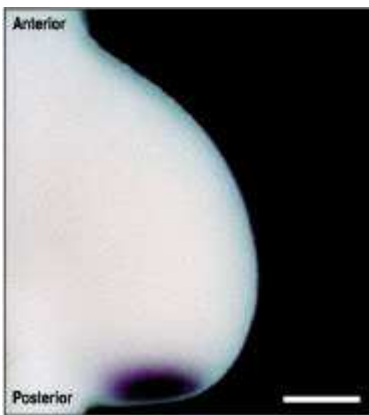
Outre son rôle essentiel dans le développement de la moelle épinière, la voie de signalisation Shh est impliquée dans de nombreux autres événements développementaux (McMahon et al., 2003). Nous allons développer trois exemples de processus dans lesquels la signalisation Shh joue un rôle central pendant le développement : la mise en place de l'asymétrie gauche /droite, le développement antéro postérieur du bourgeon de membre et le contrôle de la prolifération dans le développement des structures cérébrales.

a) La mise en place de l'asymétrie gauche/droite.

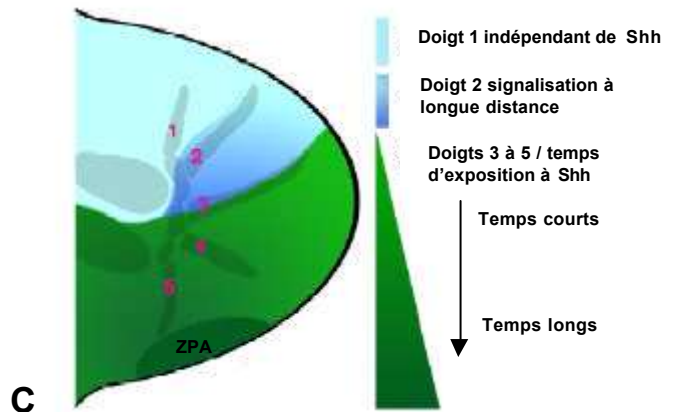
Les Vertébrés présentent une symétrie bilatérale pour la plupart de leurs organes. Mais bien que le corps des Vertébrés semble complètement symétrique d'un point de vue externe, certains organes internes sont disposés à gauche ou à droite dans l'organisme. Une des explications du processus de développement asymétrique est qu'une mise en place d'une asymétrie au niveau moléculaire soit ensuite convertie au niveau cellulaire puis au niveau de l'organe. Chez l'embryon de poulet à des stades précoces (HH5), plusieurs gènes sont exprimés de manière asymétrique de part et d'autre du nœud de Hensen. Le gène de l'*activine*, membre de la famille des *Tgfβ*, est exprimé du côté droit alors que le gène *Shh* est exprimé du côté gauche du Nœud de Hensen. Shh induit l'expression de ses cibles et indirectement du gène *Nodal* (figure 13). Si une greffe de cellules exprimant *Shh* est réalisée du côté droit du nœud de Hensen l'expression de *Nodal* devient symétrique et la mise en place de l'asymétrie gauche droite se fait alors de manière aléatoire (Granata and Quaderi, 2005; Levin et al., 1995; Raya and Belmonte, 2004). L'expression asymétrique de *Shh* au niveau du Nœud de Hensen chez le poulet permet donc l'activation d'une cascade moléculaire responsable de la mise en place gauche/droite invariable des organes au sein de l'individu.



A



B



C

Figure 14 : Développement du bourgeon de membre .

A) La zone de progression se situe sous l'apical ectodermal ridge (AER). Pendant le développement du bourgeon, la zone de progression prolifère sous l'action de l'AER et s'allonge selon l'axe proximodistal pour donner naissance aux éléments du membre et notamment aux futurs os : humérus, radius ulnée et aux os des trois doigts. La position des cellules le long de l'axe antéro-postérieur est spécifiée par un signal qui vient de la zone de d'activité polarisante située du côté postérieur du bourgeon. Les cellules de la ZPA vont aussi contribuer à la formation des doigts les plus postérieurs et de l'ulnée.

B) Hybridation in situ contre le transcrite *Shh* dans un bourgeon de membre de poulet. Le gène *Shh* est exprimé dans la partie postérieure du bourgeon de membre au niveau de la zone d'activité polarisante. (D'après Principes of development, second edition, Lewis Wolpert).

C) Modèle de spécification en fonction du temps dans le bourgeon de membre de souris. Les doigts 3, 4 et 5 comportent des cellules ayant exprimé *Shh* (vert). Lors du développement du bourgeon de membre les cellules qui ont été exposées le plus longtemps à *Shh* ont l'identité la plus postérieure correspondant à la plus forte dose de morphogène alors que les autres prennent un destin plus antérieur (D'après Zeller STKE,2004)

b) Le développement antéro postérieur du bourgeon de membre.

Les membres des Vertébrés dérivent de structures embryonnaires qui apparaissent au cours de l'organogenèse sur les cotés de l'embryon et qu'on appelle les bourgeons de membres. Les bourgeons de membres sont composés de mésoderme et d'une couche d'ectoderme qui les recouvre. Les éléments squelettiques et les tissus connectifs dérivent du mésoderme mais les muscles sont formés par des myoblastes qui vont coloniser le membre par migration à partir des somites (Buckingham et al., 2003). Les membres ont plusieurs axes de développement : un axe proximo distal qui part de la base du membre et qui va jusqu'à son extrémité, un axe antéropostérieur qui est parallèle à l'axe du corps (qui va , chez l'homme, pour les membres antérieurs : du petit doigt jusqu'au pouce, chez la souris : du doigt 5 au doigt 1, chez le poulet : du doigt 4 au doigt 2 (figure 14A)) et enfin l'axe dorso-ventral qui va par exemple chez l'homme du dos à la paume de la main (pour revue voir (Logan, 2003)).

A l'extrémité distale du bourgeon de membre se trouve une structure ectodermique appelée « Apical Ectodermal Ridge » (AER) qui délimite la frontière dorso-ventrale du bourgeon de membre. Une zone de progression composée de cellules mésenchymateuses indifférenciées en prolifération est localisée sous l'AER (figure 14A). Ce n'est que quand les cellules quittent la zone de progression qu'elles commencent à se différencier. Les parties les plus proximales du bourgeon de membre commencent à se différencier en premier et au fur à mesure du développement la différenciation s'étend progressivement de manière proximo-distale. L'AER est une structure fondamentale dans la croissance et la régionalisation du membre selon l'axe proximo distal. En effet, l'AER est capable d'induire et de maintenir la zone de progression. Si l'on procède à une ablation de l'AER par microchirurgie on observe une diminution de croissance et une troncation des parties distales du membre. Plus l'ablation de l'AER est faite tôt plus les effets sont importants; par contre une ablation tardive résulte dans la perte de structures les plus distales. L'ablation de l'AER résulte en une baisse de la prolifération dans la zone de progression. L'AER est donc une région organisatrice cruciale dans le développement des membres de vertébrés (pour revue voir (Tickle, 2004)).

L'autre région fondamentale dans le développement du bourgeon de membre est une structure mésodermique située en bordure postérieure du bourgeon appelée la zone d'activité polarisante (ZPA) (figure 14A). Chez le poulet, si la ZPA issue d'un bourgeon de membre précoce est greffée au niveau de la partie antérieure d'un autre bourgeon de membre précoce

il en résulte une duplication en miroir de la structure: au lieu d'avoir une organisation classique des doigts 4, 3 et 2 on obtient une organisation du type 4,3,2,2,3,4. La ZPA présente donc la propriété d'organiser le développement antéropostérieur du bourgeon de membre. De manière intéressante, la greffe d'un plus petit nombre de cellules de la ZPA résulte dans le développement ectopique d'un seul doigt surnuméraire d'identité 2 (pour revue (Panman and Zeller, 2003)). Une hypothèse expliquant l'activité de la ZPA le long de l'axe antéropostérieur du bourgeon est que cette structure puisse produire un morphogène qui forme un gradient postero-anterieur décroissant. Les cellules pourraient interpréter leur position et donc leur identité en fonction de la concentration de morphogène qu'elles ont reçu. Le doigt 4 se développerait à une haute concentration, le doigt 3 à une concentration plus faible et le doigt 2 à une faible concentration. Plusieurs données font de Shh un bon candidat pour être le signal responsable de l'activité inductrice de la ZPA. Le gène *Shh* est tout d'abord exprimé dans la ZPA des bourgeons de membre (figure 14B). Une greffe de cellules qui surexpriment *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon de membre est capable de mimer l'effet inducteur de la ZPA (Riddle et al., 1993). Enfin, les embryons de souris *Shh* *-/-* présentent des défauts de formation des parties distales des membres et notamment l'absence de tous les doigts à l'exception du doigt le plus antérieur (Chiang et al., 1996). Des données récentes obtenues chez la souris montrent que les cellules ayant exprimé *Shh* et issues de la ZPA vont contribuer elles même à la formation des trois doigts les plus postérieurs et à l'ulnée (os postérieur). Seul le doigt 2 dépourvu de cellules ayant exprimé *Shh* nécessiterait alors une diffusion à longue distance de Shh alors que le doigt 1 est indépendant de Shh. Les études de marquage de cellules ayant exprimé *Shh* ou ayant répondu à Shh suggèrent que la durée d'exposition va aussi contribuer à l'acquisition de l'identité des doigts. Dans ce cas, l'identité des doigts 5 à 3 ne serait pas spécifiée uniquement par la dose mais aussi par la durée d'exposition à Shh (figure 14 C) (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004; Zeller, 2004).

L'ensemble de ces données montre que la protéine Shh joue un rôle crucial dans la spécification de l'identité des doigts pendant le développement anteropostérieur du bourgeon de membre.

c) **Shh et contrôle de la prolifération dans le développement des structures cérébrales.**

L'effet de Shh sur la prolifération cellulaire a particulièrement bien été étudié pendant le développement du cerveau. Comme nous l'avons décrit précédemment le tube neural va être à l'origine de l'encéphale dans sa partie antérieure et de la moelle épinière dans sa partie postérieure. Dans sa partie antérieure, le tube neural va subir des changements morphologiques importants, nécessaires à la formation des diverses structures cérébrales. Le tube neural va d'abord former trois vésicules primaires correspondant au cerveau antérieur (prosencephale), au cerveau moyen (mésencéphale) et au cerveau postérieur (rhombencéphale). Ces trois vésicules vont par la suite se subdiviser en cinq vésicules secondaires. Le cerveau antérieur va se subdiviser en télencéphale dans sa partie antérieure et en diencéphale dans sa partie postérieure. Le télencéphale va notamment former les hémisphères cérébraux, le diencéphale va former, entre autre, les régions thalamiques et hypothalamiques du cerveau. Le rhombencéphale va lui se subdiviser en métencéphale dans sa partie antérieure et en myélocéphale dans sa partie postérieure. Le métencéphale et le myélocéphale vont contribuer à la formation du cervelet.

La voie de signalisation Shh a été impliquée dans la croissance des structures neurales à l'origine de la formation des structures cérébrales (pour revue (Ruiz i Alataba et al., 2002)). En effet, l'analyse d'embryon *Shh* *-/-* révèle un défaut de prolifération au niveau des structures ventrales et dorsales du diencéphale et du mésencéphale (Ishibashi and McMahon, 2002). Ce défaut de prolifération est corrélé avec une perte d'expression de *Cycline D1*. Dans cette région il a été proposé que Shh régule la *Cycline D1* en induisant une signalisation relais pouvant induire une compétence des cellules à répondre à des signaux de type Wnt (Ishibashi and McMahon, 2002). Il a également été montré qu'une ablation du mésoderme axial entraîne une baisse de la prolifération et une augmentation de la mort cellulaire au niveau du mésencéphale. Dans ce contexte le développement normal du mésencéphale peut être restauré par une greffe de cellules qui sur-exprime *Shh* (Britto et al., 2002). Ces données montrent que la signalisation Shh est responsable de la prolifération et donc du développement correct des structures mésencéphaliques et diencéphaliques.

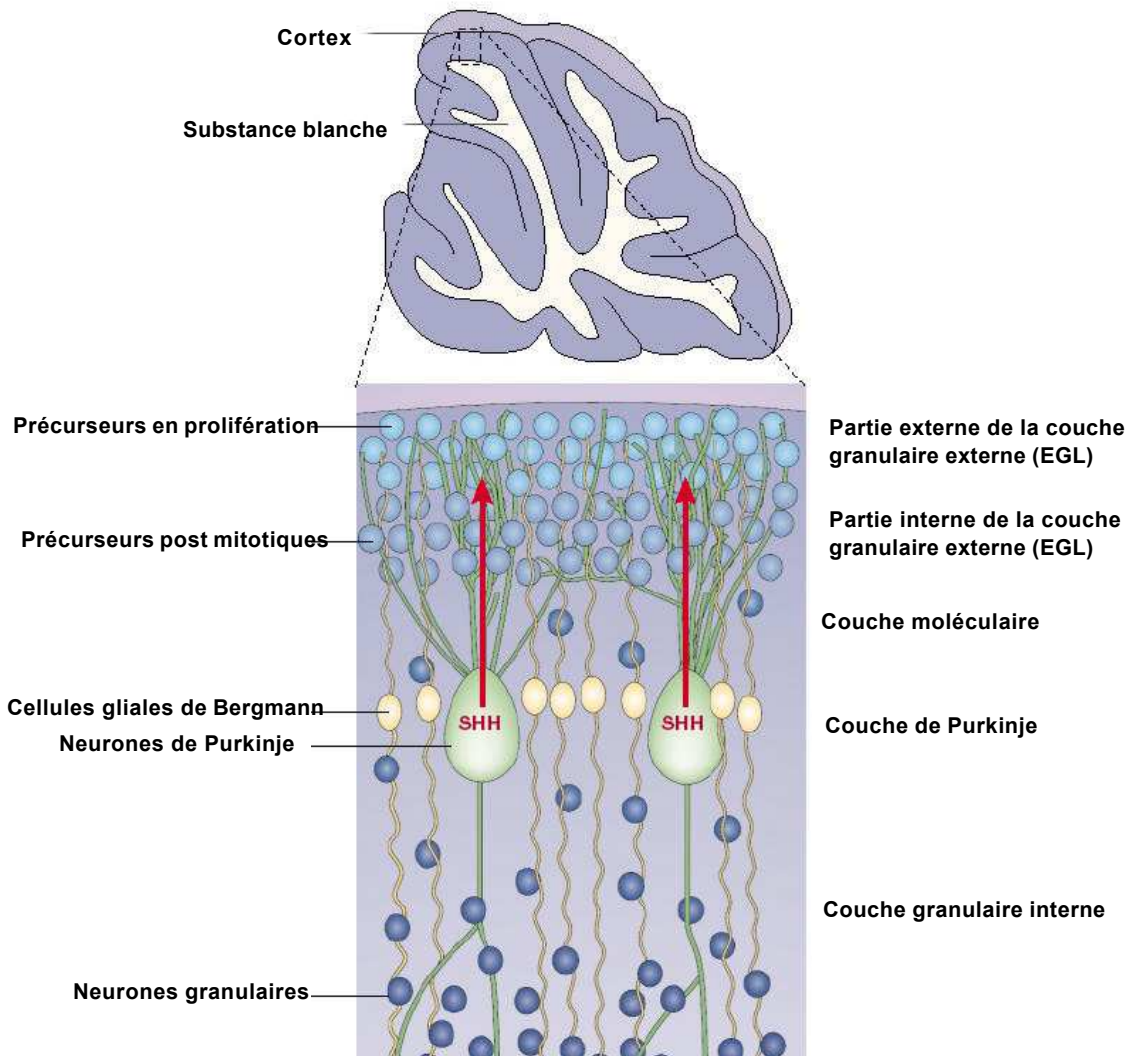


Figure 15 : Rôle prolifératif de Shh dans le cervelet.

Représentation schématique d'un cervelet de nouveau né montrant la position de différents types cellulaires dans le cortex (zone agrandie). Les précurseurs des neurones granulaires sont en prolifération dans la partie externe de la couche granulaire externe (EGL). La prolifération ces précurseurs est dépendante de Shh qui est sécrétée par les cellules de Purkinje. Shh stimule aussi la différenciation des cellules gliales de Bergmann. Les précurseurs post mitotiques des neurones granulaires effectuent une migration à travers les couches moléculaires et de Purkinje pour se localiser dans la couche granulaire interne. (d'après Ruiz i Altaba, Nature review Neuroscience,2002)

A des stades plus tardifs du développement, la partie dorsale du cerveau (le cervelet, le tectum et le cortex) va subir une croissance rapide. Dans le cervelet, Shh est responsable de la prolifération des précurseurs des cellules granulaires (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). La protéine Shh est sécrétée par une couche interne de cellules différenciées : les neurones de Purkinje. Shh va avoir une action proliférative sur les précurseurs des cellules granulaires qui se trouvent dans une couche de cellules plus externe dans le cervelet (figure 15). D'autre part, il a aussi été montré que Shh exerce un contrôle positif de la prolifération dans d'autres structures cérébrales dorsales. En effet, Shh est synthétisé dans des couches de cellules différenciées du cortex et du tectum. Les précurseurs neuraux qui répondent à Shh sont localisés dans les zones ventriculaires et subventriculaires de ces structures. Des analyses de gain et de perte de fonction de la voie de signalisation ont ainsi pu montrer que Shh module positivement la prolifération des précurseurs neuraux dans le cortex et le tectum (Dahmane et al., 2001).

Dans le cerveau adulte la neurogenèse a lieu dans la zone sous ventriculaire du troisième ventricule en relation avec la régénération des interneurons du bulbe olfactif et dans le gyrus denté de l'hippocampe (Taupin and Gage, 2002). Dans ces deux zones la signalisation Shh a été impliquée dans la prolifération des précurseurs neuraux participant ainsi à la neurogenèse chez l'adulte (Lai et al., 2003; Machold et al., 2003; Palma et al., 2005; Palma and Ruiz i Altaba, 2004).

L'ensemble de ces données montre que Shh contrôle la prolifération des précurseurs neuraux au niveau des structures cérébrales pendant le développement comme chez l'adulte. De manière intéressante, des dérégulations de la voie de signalisation Shh sont associées à l'apparition de tumeurs du cerveau (Goodrich et al., 1997; Ruiz i Altaba et al., 2004).

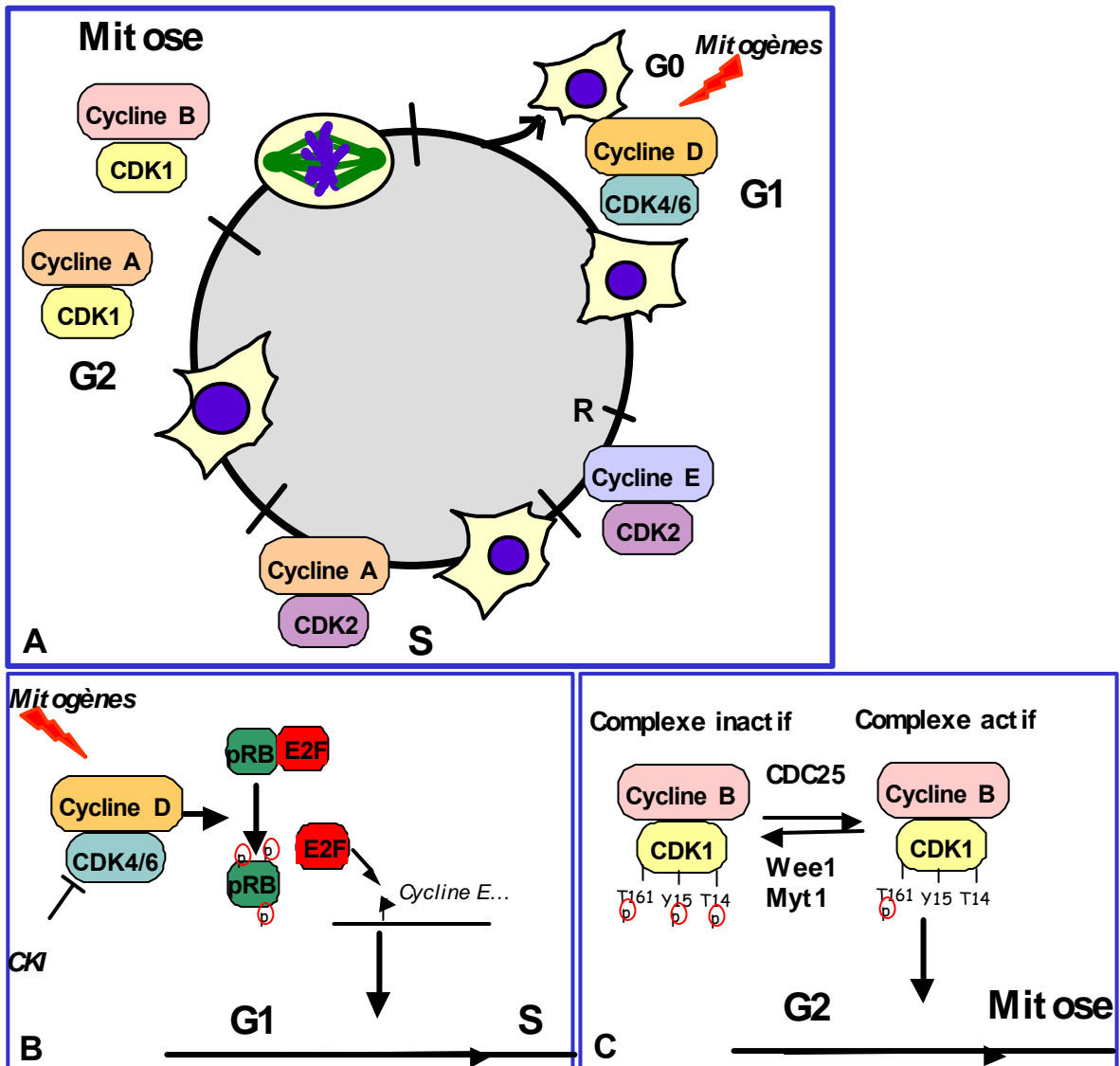


Figure 16 : Mécanismes de régulation du cycle cellulaire.

A) La progression d'une cellule dans du cycle cellulaire est contrôlée par les complexes CDK/cyclines spécifiques des différentes phases: par exemple les complexes CDK4/6 cyclines D agissent pendant la progression au cours de la phase G1, CDK1/ Cycline B agit à la transition G2/M. L'induction des cyclines D par des signaux mitogènes est nécessaire à la progression des cellules en début de phase G1 jusqu'au point de restriction (R). Après le point R la progression des cellules dans le cycle est indépendante de ces signaux. B) En phase G1, l'activité des complexes CDK/Cycline peut être inhibée par des inhibiteurs de CDK (CKI). Les complexes CDK/Cycline actifs vont phosphoryler la protéine Rb qui va libérer le facteur de transcription E2F. E2F va ainsi stimuler la transcription de gènes nécessaires à la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire. C) Pendant la phase G2 du cycle cellulaire les kinases Wee1 et Myt1 vont maintenir le complexe CDK1/cycline B dans un état inactif. La déphosphorylation de ce complexe par les phosphatases CDC25 vont activer le complexe et permettre la transition de la phase G2 à la mitose.

B/ Régulateurs du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est divisé en deux phases principales : l'interphase et la phase de mitose. Pendant l'interphase la cellule progresse d'abord dans la phase G1 (intervalle 1), puis elle entre dans la phase S qui est la phase de réplication de l'ADN, enfin la cellule progresse dans la phase G2 (intervalle 2) avant de rentrer dans la phase de mitose. Pendant la mitose la cellule mère va se diviser en deux cellules filles qui vont pouvoir recommencer ou pas un nouveau cycle. Une cellule peut sortir du cycle cellulaire au niveau du début de la phase G1 pour entrer dans la phase G0 ou elle pourra devenir quiescente ou se différencier. Le choix d'une cellule de rester ou de quitter le cycle cellulaire se fait pendant la phase G1 du cycle et est influencée par l'action de facteurs mitogènes. Le point de restriction qui se situe en fin de phase G1 est défini comme le point à partir duquel le cycle cellulaire continue en absence de signaux mitogènes. La progression dans le cycle cellulaire et donc la transition entre les différentes phases du cycle est contrôlée par l'activité de kinases dépendantes des Cyclines (CDK) (figure 16A). L'activité des CDKs est régulée au cours du cycle cellulaire. Les différentes régulations ont lieu par l'association des Cyclines aux CDK (régulation activatrice), par des événements de phosphorylation/déphosphorylation (régulations activatrices ou inhibitrices) ainsi que par liaison à des protéines inhibitrices. Ainsi l'activité des complexes CDK/Cycline est inhibée par des inhibiteurs de CDK, ou CKIs. Les CKIs de la famille des Ink4 (p16, p15, p18, p19) inhibent les complexes CDK4/6 en entrant en compétition avec les Cyclines D pour la liaison à la CDK. Les CKIs de type Cip/Kip (p21, p27, p57) agissent sur tous les complexes Cyclines /CDK en formant des complexes trimériques (Sherr and Roberts, 1999).

Pendant la phase G1 du cycle cellulaire, des signaux de croissance appropriés provenant de l'environnement stimulent la synthèse des Cyclines de type D qui s'associent aux complexes CDK4/6 permettant leur activation. Ainsi en réponse aux signaux extracellulaires le déclenchement de la voie de transduction RAS/MAPK va conduire à l'activation transcriptionnelle de la *Cycline D1* (pour revue voir (Coleman et al., 2004)). Chez les Vertébrés il existe 3 gènes qui codent pour des Cyclines D: *D1*, *D2* et *D3*. Les complexes CDK4/6 / Cycline D phosphorylent la protéine pRB. Sous sa forme hyperphosphorylée pRB est inactive et libère le facteur de transcription E2F qui va activer ses gènes cibles, notamment ceux qui codent pour les Cyclines E ou A (figure 16B). Le complexe CDK2/CyclineE est responsable d'une deuxième vague de phosphorylation de pRB qui va provoquer une libération massive de E2F et une forte augmentation de la transcription de gènes dont la

fonction est nécessaire à la transition G1/S (Ho and Dowdy, 2002). Les complexes CDK2/Cycline E puis CDK2/Cycline A vont réguler la réplication de l'ADN, la duplication des centrosomes ainsi que l'inhibition des facteurs de transcription ayant agit en G1. Les complexes CDK2/Cycline A et CDK1/Cycline A et B vont ensuite assurer le déroulement de la phase G2 et le passage à la phase M. En fin de phase G2 le complexe CDK1/CyclineB va entrer dans le noyau où il va phosphoryler ses substrats et ainsi promouvoir l'entrée en mitose (Doree and Hunt, 2002). L'activation du complexe CDK1/CyclineB est donc une phase essentielle pour la transition G2/M. Pendant la phase G2 le complexe CDK1/Cycline B subit une activation par phosphorylation sur sa Thréonine 161 par la protéine kinase CAK. Le complexe est maintenu inactif par d'autres phosphorylations par les protéines kinase Wee1 et Myt 1 sur les résidus Tyrosine 15 et Thréonine 14. L'activation du complexe CDK1/cycline B permettant le déclenchement de la mitose se fait par déphosphorylation des résidus Tyrosine 15 et Thréonine 14 par les protéines phosphatase de la famille CDC25 (figure 16C) (Kristjansdottir and Rudolph, 2004; Smits and Medema, 2001). Il existe 3 gènes codant pour les phosphatases de type CDC25 : *CDC25A*, *CDC25B* et *CDC25C*. *CDC25A* agit principalement à la transition G1/S et participerait également au contrôle de la G2/M, *CDC25B* et *C* produisent leur action à la transition G2/M en agissant sur les complexes CDK2/Cycline A, CDK1/Cycline A, CDK1/Cycline B (Kristjansdottir and Rudolph, 2004). *CDC25B* est activé plus tôt que *CDC25C* dans le cycle cellulaire, l'activité de la phosphatase *CDC25B* commençant en fin de phase S son pic d'activité se situant au cours de la phase G2 (Lammer et al., 1998). La surexpression de *CDC25B* est capable d'induire une entrée prématurée des cellules en mitose alors que *CDC25C* en est incapable. *CDC25B* est donc considéré comme le déclencheur de l'entrée en mitose (Karlsson et al., 1999). De manière intéressante, en plus de la régulation cycle cellulaire de son expression, la régulation de *CDC25B* se fait de manière régionalisée au cours du développement de la souris (Kakizuka et al., 1992).

C/ Liens entre Shh et les régulateurs du cycle cellulaire.

Le rôle de Shh sur la prolifération des précurseurs neuraux pose la question des interactions de la voie avec la machinerie du cycle cellulaire. Chez la drosophile la signalisation Hh induit l'expression de *Cycline D* et *Cycline E* qui vont favoriser l'augmentation de masse cellulaire et la prolifération (Duman-Scheel et al., 2002). Chez les Vertébrés, plusieurs études montrent des liens entre la signalisation Shh et les Cyclines D. En

effet, Shh induit d'une part l'expression de *Cycline D2* et d'autre part du facteur de transcription *N-Myc* qui régule positivement l'expression de *Cycline D1*, *E2F* et induit la prolifération des précurseurs des cellules granulaires du cervelet de souris (Kenney et al., 2003; Kenney and Rowitch, 2000; Oliver et al., 2003). La *Cycline D2* à été proposée comme étant une cible directe de Gli1 en lignée cellulaire humaine (Yoon et al., 2002). L'invalidation du gène *Cycline D2* entraîne une perte des cellules granulaires et une réduction de taille du cervelet dont la croissance dépend de Shh (Huard et al., 1999). L'absence de prolifération dans les parties dorsales et ventrales diencéphaliques et mésencéphaliques des embryons *Shh* ^{-/-} est corrélée avec une baisse d'expression de *Cycline D1* (Ishibashi and McMahon, 2002). Comme de nombreux mitogènes, Shh régule donc positivement l'expression des Cyclines D. La voie de signalisation Shh peut aussi réguler l'action des complexes CDK /Cyclines en modulant l'action des inhibiteurs des CDKs. En effet Shh abolit l'arrêt du cycle cellulaire induit par le CKI p21 dans des cellules épithéliales (Fan and Khavari, 1999). Certaines données suggèrent que Shh pourrait aussi avoir une action pendant la phase S du dernier cycle cellulaire avant la différenciation des précurseurs neuraux en motoneurones (Ericson et al., 1996). Ces données ne montrent cependant pas de lien entre la voie de signalisation et des composants de la machinerie du cycle cellulaire agissant à cette phase. Par contre, il a été montré qu'un lien existe entre la signalisation Shh et la transition G2/M. En effet, le récepteur à Shh Ptc peut interagir avec la Cycline B1. La présence de Shh inhibe cette interaction et permet la localisation nucléaire de la Cycline B1 (Barnes et al., 2001). Les auteurs proposent que la voie de signalisation Shh participe via Ptc au contrôle de la transition G2/M en régulant la localisation du complexe CDK1/Cycline B.

Projet de thèse :

La voie de signalisation Shh est cruciale pour le développement de la partie ventrale du tube neural. Dans cette région, Shh contrôle à la fois la spécification et la prolifération des cellules précurseurs neuraux. Les mécanismes moléculaires du contrôle de la prolifération cellulaire médié par cette voie de signalisation dans le tube neural sont encore mal compris. Afin d'élucider ces mécanismes nous avons identifié des régulateurs du cycle cellulaire exprimés dans la partie ventrale du tube neural de poulet. Nous avons ensuite testé si ces régulateurs répondaient à la voie de signalisation Shh. Enfin, nous avons analysé l'importance de leur régulation et de leur fonction dans le contrôle de la prolifération des précurseurs neuraux du tube neural.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressé à l'expression, la régulation et à la fonction de Cyclines D qui agissent en phase G1 du cycle et qui sont connues pour leur rôle dans le couplage des voies de signalisation à la machinerie du cycle cellulaire. L'étude du patron d'expression d'autres régulateurs du cycle cellulaire nous a ensuite amené à nous intéresser à l'expression de régulateurs de la transition G2/M: les phosphatases de type CDC25

RESULTATS

I/ Contrôle de la prolifération dans l'ébauche de moelle épinière : Régulations et fonctions des Cyclines D1 et D2.

A/ Synthèse de l'article.

Chez les Vertébrés, la croissance rostro-caudale de l'ébauche de moelle épinière requiert la voie de signalisation FGF qui maintient une «zone souche » en région caudale de l'embryon composée de cellules précurseurs neuraux en prolifération. La majorité des cellules qui quittent cette zone souche continuent de proliférer mais modifient leur programme transcriptionnel en réponse au facteur ventralisant Shh. La première partie de mes travaux de thèse a eu pour objectif d'identifier les Cyclines D susceptibles de coupler ces voies de signalisations à la machinerie du cycle cellulaire et donc de participer au contrôle de la prolifération des cellules précurseurs neuraux. Il existe 3 gènes codant pour les Cyclines D chez les Vertébrés, *D1*, *D2* et *D3*, nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes *Cycline D1* et *Cycline D2*.

Nous avons observé que *Cycline D2* est exprimée dans la plaque neurale caudale et dans la gouttière neurale, zone sous influence du FGF, alors que *Cycline D1* est exprimé dans la partie ventrale de la gouttière neurale et dans le pré-tube neural comme les gènes de réponse à Shh. L'expression de ces deux gènes est par la suite restreinte temporairement à la partie dorsale du tube neural alors que la différenciation neuronale débute dans le tube neural. Nous avons démontré par des expériences de perte et de gain de fonction que la signalisation du FGF régule positivement l'expression de *Cycline D2* alors que cette voie de signalisation inhibe l'expression de *Cycline D1*. Nous avons aussi montré par des expériences de gain et de perte de fonction que la voie de signalisation Shh régule positivement l'expression de *Cycline D1*. Cet effet est spécifique de *Cycline D1* puisque nous n'observons pas d'effet sur l'expression de *Cycline D2*. L'expression de *Cycline D2* dans la plaque neurale fait donc partie du programme caudalisant dépendant du FGF. L'expression de *Cycline D1* dans la gouttière et le pré-tube neural dépend de la signalisation Shh.

Notre objectif a alors été de déterminer l'importance de la régulation positive des ces Cyclines sur le contrôle de la prolifération et la séquence temporelle d'initiation de la neurogenèse. L'expression forcée de la Cycline D1 ou de la Cycline D2 dans le tube neural inhibe la différenciation neuronale et augmente la proportion de précurseurs neuraux en prolifération.

Nous proposons donc que dans la plaque et la gouttière neurale la signalisation FGF maintient les précurseurs neuraux en prolifération en régulant positivement l'expression de *Cycline D2*. Dans le pré-tube neural le relais est pris par la Cycline D1 dont l'expression est dépendante de l'atténuation de la signalisation FGF et de l'activation la signalisation Shh. Au niveau du tube neural la restriction dorsale des deux *Cyclines D* va être un événement nécessaire à l'apparition des premiers neurones différenciés. L'ensemble de ces résultats montre que des voies de signalisation distinctes peuvent influencer l'équilibre entre prolifération et différenciation dans des domaines précis de précurseurs neuraux en contrôlant spécifiquement l'expression de différentes *Cyclines D*.

B/ ARTICLE.

Specific regulation of *cyclins D1* and *D2* by FGF and Shh signalling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development.

Developmental Biology 273 (2004) 195– 209

Specific regulation of *cyclins D1* and *D2* by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development

Valérie Lobjois^{a,1}, Bertrand Benazeraf^{a,1}, Nicolas Bertrand^b,
François Medevielle^a, Fabienne Pituello^{a,*}

^aCentre de Biologie du Développement, CNRS UMR5547 Bât 4R3, 31062 Toulouse cedex, France

^bUniversité de la Méditerranée, IBDM-UMR6156, 13288 Marseille cedex 09, France

Received for publication 7 November 2003, revised 28 April 2004, accepted 25 May 2004

Available online 20 July 2004

Abstract

In the vertebrate embryo, spinal cord elongation requires FGF signaling that promotes the continuous development of the posterior nervous system by maintaining a stem zone of proliferating neural progenitors. Those escaping the caudal neural stem zone, which is expressed to Shh signal, initiate ventral patterning in the neural groove before starting neuronal differentiation in the neural tube. Here we investigated the integration of D-type cyclins, known to govern cell cycle progression under the control of extracellular signals, in the program of spinal cord maturation. In chicken embryo, we find that *cyclin D2* is preferentially expressed in the posterior neural plate, whereas *cyclin D1* appears in the neural groove. We demonstrated by loss- and gain-of-function experiments that FGF signaling maintains *cyclin D2* in the immature caudal neural epithelium, while Shh activates *cyclin D1* in the neural groove. Moreover, forced maintenance of *cyclin D1* or *D2* in the neural tube favors proliferation at the expense of neuronal differentiation. These results contribute to our understanding of how the cell cycle control can be linked to the patterning programs to influence the balance between proliferation and neuronal differentiation in discrete progenitor domains.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cyclin D; FGF; Shh; Proliferation; Neurogenesis; Spinal cord; Chick

Introduction

During vertebrate development, the spinal cord elongates progressively in a rostrocaudal sequence. Spinal cord morphogenesis proceeds via two temporally and spatially distinct phenomena, primary and secondary neurulation, that give rise to the cervicothoracic and lumbosacral regions, respectively (Le Douarin et al., 1998). During primary neurulation, the caudal neural plate invaginates to form the neural groove, which closes progressively to give rise to the neural tube (Smith and Schoenwolf, 1997). All the early stages of spinal cord morphogenesis are represented in the caudal region of 6–10 somite stage chicken embryos

(Catala et al., 1996), in which the neural plate is situated behind Hensen's node, the neural groove is rostral to the node and the closing neural tube is at the level of the last individualized somite.

This progressive molding of the spinal cord primordium is correlated with modifications in the expression of transcription factors. For instance, the caudal neural plate and neural groove express the proneural gene homologue *Cash4* (Diez del Corral et al., 2002; Henrique et al., 1997; Storey et al., 1998) and the homeobox-containing gene *Sax1* (Bertrand et al., 2000; Diez del Corral et al., 2002; Spann et al., 1994); the closing neural tube expresses the paired box-containing gene *Pax6* and the Iroquois family gene *Irx3* (Bertrand et al., 2000; del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003; Pituello et al., 1999). The transition between the “caudal program” (*Cash4*^{on}, *Sax1*^{on}, *Pax6*^{off}, and *Irx3*^{off}) and the “neural tube program” (*Cash4*^{off}, *Sax1*^{off}, *Pax6*^{on}, and *Irx3*^{on}) is controlled by the paraxial mesoderm via the opposing actions of the FGF and retinoid signaling path-

* Corresponding author. Centre de Biologie du Développement, CNRS UMR5547 Bât 4R3, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France. Fax: +33-561-55-65-07.

E-mail address: pituello@cict.fr (F. Pituello).

¹ These authors have contributed equally to this work.

ways (Bertrand et al., 2000; del Corral et al., 2003; Diez del Corral et al., 2002; Novitch et al., 2003; Pituello et al., 1999). Thus, the caudorostrally decreasing gradient of FGF signaling issued from the presomitic mesoderm maintains caudal expression of *Sax1* and *Cash4* whereas it prevents activation of *Pax6*. While FGF signaling decreases in the neural groove, expression of *Pax6* and *Irx3* is enhanced by retinoid signaling from the somite (del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003). Furthermore, FGF8 represses retinoic acid (RA) synthesis and RA down-regulates FGF8; these cross-regulatory interactions contribute to coordinating transcriptional programs as the spinal cord progressively matures (del Corral et al., 2003). The expression of *Pax6* and *Irx3* is then rapidly down-regulated in the ventral neural groove as a consequence of the appearance of Shh ventralizing activity, which in the mean time up-regulates the expression of homeodomain proteins such as *Nkx6* and *Nkx2* (Briscoe et al., 2000). FGF signaling exerts a weak repression on these transcription factors, preventing the caudal neural plate from expressing the ventralizing program prematurely (del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003). FGF signaling also contributes to the establishment of the rostrocaudal expression pattern of genes of the *HOXC* complex in motor neurons (Liu et al., 2001) and to the fixing of the anterior boundary of *HoxB* expression in the spinal cord (Bel-Vialar et al., 2002). Thus, as the rostral limit of FGF activity retreats following the regression of Hensen's node, the "neural tube transcriptional program," which reflects a more advanced state of neural epithelial development, progresses caudally in synchrony with neural tube closure; the neural plate and neural groove, still under the influence of FGF, are maintained in an immature state (Bertrand et al., 2000; del Corral et al., 2003; Diez del Corral et al., 2002; Novitch et al., 2003).

With the exception of certain spinal interneurons that withdraw from the cell cycle early on (Langman and Haden, 1970; McConnell and Sechrist, 1980; Nornes and Carry, 1978; Nornes and Das, 1974; Sechrist and Bronner-Fraser, 1991), the neural plate-neural groove region is composed of actively proliferating neural progenitor cells. A few scattered cells expressing *C-Delta-1* and considered as prospective newly born neurons appear in the closing neural tube region of 7–10 somite stage embryos (Henrique et al., 1995; F. Pituello unpublished observations). Neuronal differentiation begins soon after neural tube closure and proceeds in a head-to-tail sequence following elongation of the spinal cord primordium. It has been demonstrated that attenuation of FGF signaling is also a prerequisite for the initiation of neuronal differentiation (Diez del Corral et al., 2002).

Besides controlling the transcriptional program related to neural progenitor cell maturation and the onset of neuronal differentiation, the presomitic mesoderm and FGF signaling also organize changes in the pattern of cell mobility in the caudal spinal cord primordium (Mathis et al., 2001; Stern et al., 1991). It has been proposed that a

proliferative "stem zone" is located adjacent to Hensen's node (Mathis et al., 2001). While some neural progenitor cells continue to reside in this region during spinal cord elongation, others are displaced from the stem zone and spread out along the neural groove by convergent extension movements that gradually slow down as the cells move away from the caudal region (Mathis et al., 2001; Stern et al., 1991). Expression of a dominant-negative FGF receptor in the caudal neural plate region drastically interferes with the elongation of the spinal cord primordium because cells leave the stem cell zone prematurely and change their pattern of movement as if they had aged. FGF signaling could thus promote the continuous development of the posterior nervous system by maintaining a stem zone of proliferating progenitors that contribute sequentially to the elongating spinal cord during the regression of Hensen's node (Mathis et al., 2001). Taken together, these observations indicate that FGF signaling plays a key role in the control of spinal cord maturation by maintaining the caudal neural progenitor cells in an immature state.

How the control of cell cycle progression is integrated in the early phases of spinal cord maturation remains unknown. Interestingly, during mouse central nervous system development, it has previously been reported that the three *cyclins D* (*D1*, *D2*, and *D3*) are expressed in dynamic, and often complementary, domains along the anteroposterior (A/P) axis, including at the neural groove-neural tube transition (Wianny et al., 1998). Induced by growth factor stimulation, D-type cyclins assemble with cyclin-dependent kinases CDK4/6 to facilitate G1 progression by phosphorylating key substrates, including the tumor suppressor retinoblastoma protein (pRb) (Ho and Dowdy, 2002).

The proposed role of D-type cyclins in coupling extracellular signals to the cell cycle machinery prompted us to (i) examine *cyclins D1* and *D2* expression at the neural groove-neural tube transition in the chicken embryo and (ii) identify the signaling pathways controlling their expression in this region of the embryo, (iii) to define the influence of these regulators of progression through G1 on the balance between proliferation and neuronal differentiation.

Materials and methods

Embryos

Fertile hens' eggs, obtained from a local supplier, were incubated at 38°C in a humidified incubator to yield embryos of appropriate stages (Hamburger and Hamilton, 1992).

Microsurgery

Embryos at the 7–10 somite stage were prepared, operated, and incubated as described in details elsewhere

(Pituello et al., 1999). For deletion of the presomitic mesoderm, embryos were pinned dorsal side down, through the area opaca, on Sylgard-coated dishes containing Tyrode's solution. The embryos were operated on from ventral side to preserve the normal relationship of the neuroepithelium with the nonneural ectoderm and the notochord and reincubated in the dish at 38°C in a humidified atmosphere for 3 h.

Heparin-coated acrylic beads were rinsed in PBS for 15 min and incubated in FGF8 or FGF4 (50 µg/ml), or in FGF7 (250 µg/ml). After 2 h on ice, the beads were rinsed in PBS and grafted. Control beads were incubated in PBS. The presomitic mesoderm extending from level–I to Hensen's node or only a piece of it (level–II) was eliminated on one side of the embryo, a bead was grafted at level–II, and the embryo was reincubated in Tyrode's solution for 2 1/2 to 3 h at 38°C (Bertrand et al., 2000).

Drug administration

Inhibition of FGFR1 signaling was achieved by incubating embryos in petri dishes in Tyrode's solution supplemented with SU5402 (Calbiochem) (50 µM) for 4 h. Shh signaling was inhibited as described elsewhere (Incardona et al., 1998). Briefly, cyclopamine (Toronto Research Chemical) was produced by suspending 1 mg of powder in 1 ml 45% 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HBC; Sigma) in sterile PBS and stirring for 1–2 h at 65°C. One to 2 µg equivalent of cyclopamine–HBC solution was injected in ovo in the neural tube–neural groove region. The eggs were then reincubated for 6–7 or 12 h. Control embryos were treated with HBC alone under the same conditions.

Electroporation

The entire *Shh* cDNA (a gift from C. Tabin) was cloned in pIRES2-EGFP (Clontech). *Cyclins D1* and *D2* coding regions (a gift from V.J. Kidd) were inserted in pCIG (a gift from A. McMahon). This vector contains a CMV enhancer, β-actin promoter, and an internal ribosome entry sequence (IRES), followed by a nuclear localized green fluorescent protein (GFP) (Megason and McMahon, 2002). Control electroporations were carried out with pIRES2-EGFP or pCIG vector alone. The different DNA constructs were electroporated as previously described (Itasaki et al., 1999). One to 2 µg of DNA was injected in the caudal neural plate preneural tube using a glass pipette. Electrodes were positioned on each side of the sinus rhomboidalis, and four to five pulses at 18 V were applied to allow unilateral entry of the DNA into the neural primordium, the non-transfected half constituting the control.

In situ hybridization

Automated in situ hybridization was performed using an In situ Pro machine (Intavis). Detailed protocol can be

obtained on request. Manual in situ experiments were carried out essentially as described by Henrique et al. (1995) with hybridization buffer 5× SSC. Gene expression patterns were analyzed using the antisense digoxigenin–RNA probe prepared from the 5' end (870 bp) of *cyclin D1* cDNA and the coding region of *cyclin D2* cDNA (1.1 kb), gifts from V.J. Kidd; chicken *Gli 1* cDNA (2.2 kb), *Shh* cDNA (1.6 kb), and *Patched1* cDNA (802 bp), gifts from C. Tabin. *NeuroM* probe was synthesized from isolated specific PCR fragments to avoid any cross-reactivity with the transgenes. The primers used were 5'-ATGACGAAGAAGACGTACACC-3' and 5'-GTAATACGACTCACTATAG GGCTACTCGTT-GAAG-3' for *NeuroM*. *Cyclin D1*, *cyclin D2*, and *GFP* transgenes were detected using fluorescein–RNA probes synthesized on PCR templates obtained with the following primers: 5'-AGAGCGAGCGAGAGACTGAC-3' and 5'-GTAATACGACTCACTATAG GGCACATCAGTGGG-3' for *cyclin D1*; 5'-ACATGGAGTTGCTGTGCTGC-3' and 5'-GTAATACGACTCACTATAG GGCTCTCACATC-TGTG-3' for *cyclin D2*; 5'-AGTTCATCTGCACCACC-3' and 5'-GTAATACGACTCACTATAG GGCTTGACAG-CTCG-3' for *GFP*, with the underlined region corresponding to the T7 promoter. Vibratome sectioning was performed as previously described (Pituello et al., 1995).

Cell proliferation analysis

Cell proliferation was evaluated by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (BrdU labeling and detection kit I; Roche). BrdU (10 mM) was injected into the lumen of the neural tube and the embryos were harvested 30 min later. BrdU immunodetection was performed on 12 µm frozen sections.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on whole-mount embryos using the monoclonal antibody directed against the neuronal class III β-tubulin (TUJ1, BAbCO). Embryos were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C, rinsed in PBS and incubated for 20 min in 0.5% Triton X-100. After incubation for 1 h in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS, the primary antibody was applied at 1:2000 dilution in 0.1% BSA–0.5% Triton X-100 PBS, and the samples were incubated overnight at 4°C. Samples were then washed three times in 0.1% BSA PBS and incubated with appropriate biotinylated secondary antibodies (1:50; Amersham) for 4 h at room temperature or overnight at 4°C. After five washes in PBS, the samples were incubated in streptavidin–rhodamine (1:50 in PBS) for 15 min, rinsed and placed in glycerol 80% for analysis with a confocal microscope (Zeiss).

Prior performing immunohistochemistry on frozen sections, embryos were selected on GFP expression. Analyses were carried out on 12 µm frozen sections with the following combinations: the monoclonal antibody directed

against BrdU (Roche; dilution 1:10) and a polyclonal antibody recognizing the neuronal class III β -tubulin (TUJ1, Covance; dilution, 1:1000); the monoclonal antibody TUJ1 described above and the polyclonal anti-phospho-histone H3 (P-H3; Upstate biotechnology; dilution 1:1000). The sections were postfixed for 20 min in formaldehyde 3.7%. For BrdU immunodetection, sections were incubated for 30 min in 2 N HCl and rinsed twice 10 min in 0.1 M Na₂B₄O₇, pH 8.9. The sections were preblocked for 1 h in 1% BSA–0.5% Triton X-100 PBS. The primary antibody was applied at the appropriate dilution and incubated for 1 h at 37°C or overnight at 4°C. After washes in PBS 0.1% Triton, the secondary antibody was applied (rhodamine-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG; biotinylated-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG and streptavidin-alexa-647). Following washes in PBS, sections were mounted using Mowiol 4-88 (Hoechst) and observed using a confocal microscope. The percentage of transgenic neural precursor cells in S- and M-phase were determined by counting the number of total GFP nuclei per section and the number of nuclei expressing both GFP and BrdU or both GFP and P-H3 on optic confocal sections of 3 μ m in thickness.

Results

Maturation of the spinal cord primordium correlates with a dynamic expression of cyclins D1 and D2

We defined the expression domains of *cyclins D1* and *D2* by in situ hybridization, on embryos between 6 and 10 somites, focusing primarily on the neural groove–neural tube transition. During spinal cord elongation, transcripts encoding *cyclin D1* are clearly detectable in the neural groove and in the neural tube but are barely visible in the caudal neural plate (Figs. 1A–F). As can be seen on cross sections of the caudal region of a 10 somite stage embryo (Figs. 1C–F), *cyclin D1* expression is very dynamic along the dorsoventral axis of the spinal cord primordium. The transcripts appear in the neural groove on both sides of the floor plate (Fig. 1F) and expand rapidly to include the entire lateral walls of the preneural tube (Fig. 1D) before becoming restricted to the dorsal aspect of the closed neural tube (Fig. 1C). Interestingly, *cyclin D1* expression progresses in the same way in the paraxial mesoderm during embryo elongation (Figs. 1A–B). Transcripts are present in the somites and in the rostral part of the presomitic mesoderm prefiguring the next somite to be formed but are absent from the more caudal unsegmented presomitic mesoderm. The caudal limit of activation is more posterior in the neural groove (Fig. 1B, arrowhead) than in the presomitic mesoderm. Hence, the dynamics of *cyclin D1* expression along the rostrocaudal axis of the embryo suggest that this molecule is associated with the maturation both of the neuroepithelium and the paraxial mesoderm.

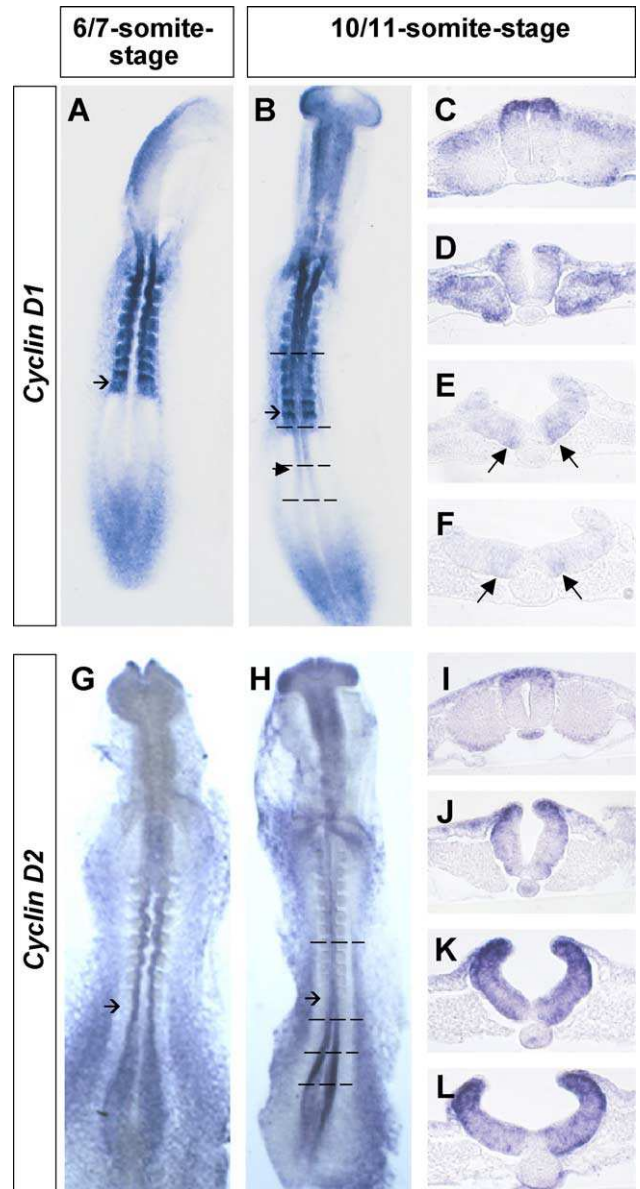


Fig. 1. Spatiotemporal pattern of expression of *cyclins D1* and *D2* during spinal cord elongation. (A–F) *Cyclin D1* expression visualized by in situ hybridization on 6 somite (A) and 10 somite (B–F) stage embryos. Note that the transcripts are detected more caudally in the neural groove than in the presomitic mesoderm (arrowhead in B). (C–F) Cross sections of a 10 somite stage embryo, respectively, at the levels of the neural groove (E and F), preneural tube (D), and neural tube (C). Notice the appearance of *cyclin D1* on both sides of the floor plate in the neural groove (arrows in E and F). (G–L) *Cyclin D2* expression visualized by in situ hybridization on 6 somite (G) and 10 somite (H–L) stage embryos. (I–L) Cross sections of a 10 somite stage embryo, respectively, at the levels of the neural groove (K and L), preneural tube (J), and neural tube (I) levels. The thin arrow marks the last segmented somite in A, B, G, and H.

Conversely to *cyclin D1*, *cyclin D2* is strongly expressed in the caudal neural plate and neural groove, and expression continues in the posterior region of the spinal cord primordium as it elongates (Figs. 1G–L). In the neural groove, the transcripts are expressed in a caudorostrally decreasing gradient (Figs. 1J–L). Cross sections through a 10 somite

stage embryo confirm the presence of a high level of transcripts in the entire neural groove except for the floor plate region (Figs. 1K and L). Expression still detectable in the preneural tube becomes rapidly restricted to the dorsal neural tube after closure (Figs. 1I and J).

Hence, the transition between *cyclins D2* and *D1* seems to accompany the switch from an early (posterior) to a later (anterior) state of neuroepithelial development. The dynamics of their expression patterns suggest that these regulators of the cell cycle may be governed by the same signaling pathways as those controlling the aging of the neuroepithelium.

Deleting the paraxial mesoderm affects the expression level of both cyclins D1 and D2 in the neuroepithelium

One key element controlling the maturation of the neuroepithelium is the paraxial mesoderm (see Introduction). Deleting the presomitic mesoderm leads to a switch from an early (posterior) to a later (anterior) state of neuroepithelial development. We decided to determine whether *cyclins D1* and *D2* were also subject to control by the presomitic mesoderm.

Deleting the presomitic mesoderm in 7–10 somite stage embryos (Fig. 2A) led, after 3 h, to a clear increase of *cyclin D1* transcripts ($n = 14/21$) (Figs. 2B–E). Interestingly, the up-regulation of *cyclin D1* displayed an obvious ventrodorsally decreasing gradient (Figs. 2C–E), reminiscent of the gradient of Shh ventralizing activity that spreads from the floor plate area (see below and Figs. 4A–D). Conversely, deleting the presomitic mesoderm resulted, within 3 h, in a dramatic decrease in *cyclin D2* transcripts ($n = 21/26$), mainly in the rostral part of the neural groove (Figs. 2G and H). The caudal part of the neural plate was not affected by these deletions (Fig. 2I).

We conclude that the presomitic mesoderm restrains the caudal progression of *cyclin D1* in the neural groove and is necessary for the maintenance of the gradient of *cyclin D2* observed in the neural plate and neural groove.

FGF activity controls the expression of the cell cycle regulators, cyclins D1 and D2, in opposite ways

FGF8 is present as a caudorostrally decreasing gradient in the presomitic mesoderm, and FGR receptor 1 (FGFR1) is expressed throughout the neuroepithelium (Bertrand et al., 2000; Walshe and Mason, 2000). The fact that deleting the presomitic mesoderm affects expression of both *cyclins D1* and *D2* encouraged us to try to determine how these cell cycle regulators are integrated in the “posteriorizing” program controlled by FGF8. So we analyzed the consequences on the expression of each cyclin after FGF signaling enhancement or blockade.

Grafting a heparin bead soaked in FGF8 at level–II and leaving the embryo until the bead had reached level–I to 0 (i.e., around 3 h after grafting) led to a down-regulation of

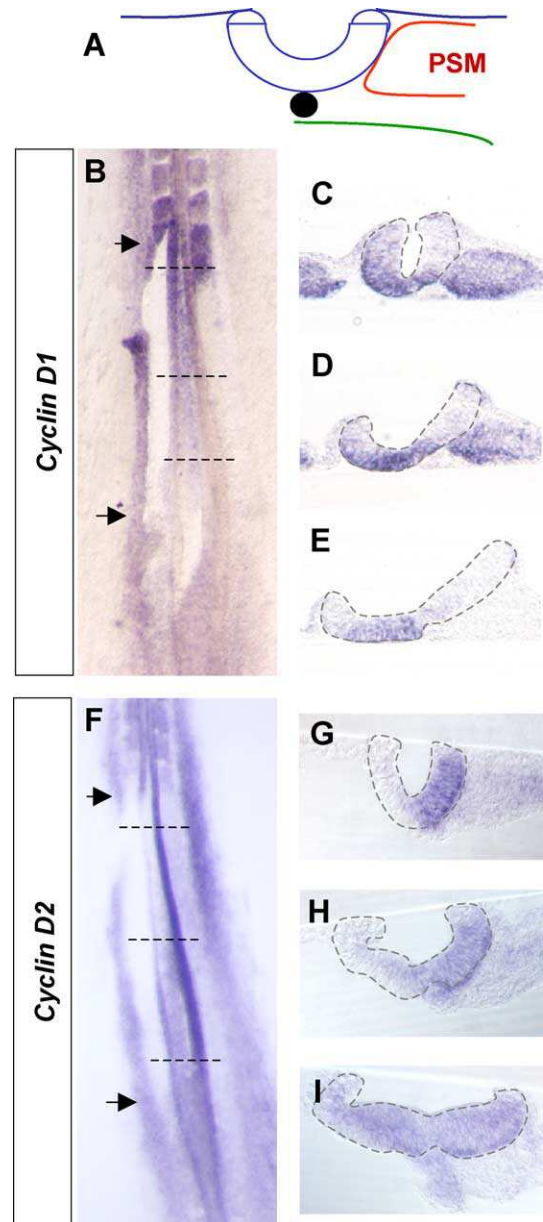


Fig. 2. The presomitic mesoderm inversely regulates expression of *cyclins D1* and *D2*. (A) Diagrammatic representation of the microsurgical deletion. Note that the normal relationship of the neuroepithelium with the nonneural ectoderm and the notochord is preserved. (B–E) In situ hybridization on 10 somite stage operated embryos revealing *cyclin D1*. Deletion of the presomitic mesoderm leads to premature activation of *cyclin D1* expression. (C–E) Cross sections at the levels shown in B (dashed lines). Note that the activation of *cyclin D1* extends from the floor plate area on the operated side. (F–I) In situ hybridization on 10 somite stage operated embryos revealing *cyclin D2*. Removal of the presomitic mesoderm leads to down-regulation of *cyclin D2* expression. (G–I) Cross sections at the levels shown in F (dashed lines). Arrows in B and F show the anterior and posterior limits of the deletion.

cyclin D1 transcripts in the preneural tube–neural tube regions ($n = 8/15$ with 4/8 embryos displaying a strong effect as shown in Figs. 3B and D and 4/8 showing a less important but clear effect), compared to grafting a heparin bead soaked in PBS ($n = 0/21$) (Figs. 3A and C). The

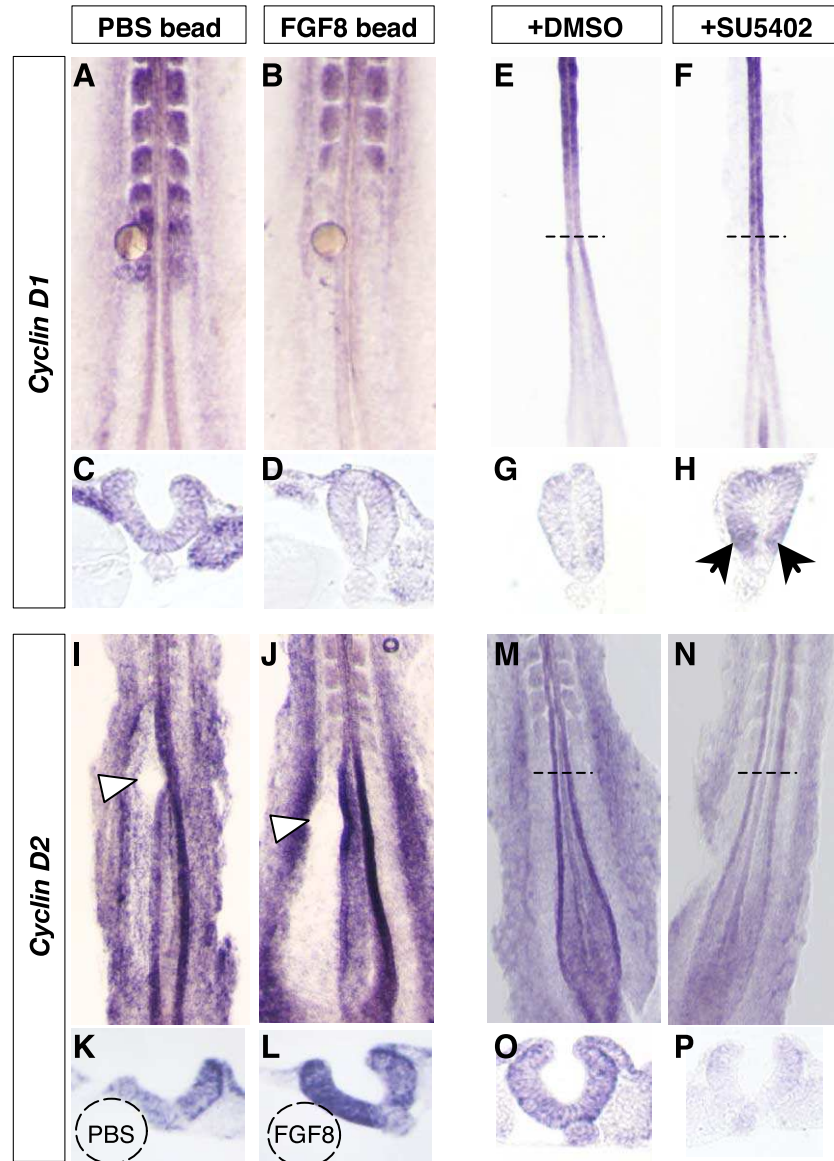


Fig. 3. FGF8 maintains *cyclin D2* expression and restrains *cyclin D1* progression in the neural groove. In situ analysis of the expression of *cyclin D1* (A–H) and *cyclin D2* (I–P) following modulation of the FGF signaling pathway. (A and C) Replacing a piece of presomitic mesoderm in position–II by a PBS-soaked bead has no effect on *cyclin D1* expression. (B and D) The same experiment performed with an FGF8-soaked bead results in a slight down-regulation of *cyclin D1* expression. (C and D) Cross sections at the level of the beads in A and B, respectively. The embryo in B is representative of the stronger effects we observed. (E–H) Treating embryos with SU5402 (F and H), an inhibitor of the FGF signaling pathway, slightly increases the level of *cyclin D1* transcripts compared with DMSO-treated embryos (E and G) as clearly visualized after paraxial mesoderm dissection. The dashed lines in E and F indicate the level of cross sections in G and H, respectively. (I–L) After deletion of presomitic mesoderm, grafting an FGF8-soaked bead restores high levels of *cyclin D2* transcripts (J and L). The down-regulation of *cyclin D2* following presomitic mesoderm deletion is unaffected by grafting a PBS-soaked bead (I and K). (K and L) Cross sections at the level of the beads (arrowheads) in I and J, respectively. (M–P) Treating embryos with SU5402 (N and P) significantly decreases the level of *cyclin D2* transcripts compared with DMSO-treated embryos (M and O). The dashed lines in M and N indicate the level of cross sections in O and P, respectively.

effect on the paraxial mesoderm appeared even more drastic (Figs. 3A–D). Conversely, treating embryos for 4 h with SU5402, a protein tyrosine kinase inhibitor that blocks autophosphorylation of receptors including FGFR1, increased the level of *cyclin D1* transcripts ($n = 10/14$) (Figs. 3E–H), mainly in two spots flanking the floor plate area. These observations suggest that FGF signaling path-

way modulates the level of *cyclin D1* expression and that a reduction of FGF signaling activity is a prerequisite for its full activation.

To see if FGF signaling pathway contributes to maintaining a high level of *cyclin D2* in the caudal neural groove, we tested whether grafting an FGF8-loaded heparin bead could rescue the effects of deleting the presomitic meso-

derm. We found this indeed to be the case: not only was a high level of *cyclin D2* expression maintained in the presence of FGF8, but it was increased compared with the contralateral control side ($n = 7/10$ versus $0/8$ with PBS-soaked beads) (Figs. 3I–L). Replacing a small piece of rostral presomitic mesoderm by an FGF8-containing bead produced a clear reinforcement of *cyclin D2* expression in the neural groove ($n = 18/24$ versus $0/9$ with PBS-soaked beads). Similar experiments were performed with other FGFs. FGF4 mimicked the effect of FGF8 ($n = 4/4$), while FGF7 (KGF) had no effect ($n = 0/3$) (data not shown). Thus, maintaining the FGF signaling pathway active is sufficient to prevent the shutdown of *cyclin D2* expression, and the subset of FGFs that is able to produce this effect is the same as that which controls the caudal transcriptional program in the posterior neural groove (see Introduction). We then asked whether the FGF signaling pathway was necessary for the maintenance of *cyclin D2* expression in the caudal neural groove. To answer this question, we blocked the FGF transduction pathway by SU5402 treatment. Under these conditions, *cyclin D2* was strongly down-regulated ($n = 12/12$ versus $0/10$ in DMSO-treated embryos) (Figs. 3M–P). These results show that the FGF signaling pathway is necessary to maintain a high level of *cyclin D2* transcripts in the neural groove.

All together, these data show that FGF8 activity sustains *cyclin D2* expression in the neural groove. Conversely, attenuation of FGF signaling is necessary for up-regulation of *cyclin D1*. The maintenance of *cyclin D2* could thus represent an integral component of the posteriorizing program controlled by the FGF signaling pathway.

Initiation of cyclin D1 expression in the neural groove depends on the activity of Shh

During CNS development, Shh is required for *cyclin D1* expression in the diencephalon and midbrain regions in early somite stage mouse embryos (Ishibashi and McMahon, 2002) and has been shown to up-regulate the level of *cyclin D1* in cerebellar granule neuron precursors (Kenney and Rowitch, 2000). Interestingly, *Shh* is expressed in the entire notochord and is detected in the floor plate at the neural groove level (Figs. 4A and C). Its target genes, such as the transcriptional regulator *Gli1*, appear in the neural groove close to the site of *cyclin D1* expression (Figs. 4B and D compare with Figs. 1B and D). We therefore asked whether the activation of *cyclin D1* in the neural groove was an early response to Shh activity in the maturing neuroepithelium.

To test this possibility, a Shh expression construct was transfected in the caudal neural plate of HH stage 10 embryos by in ovo electroporation. As shown in Figs. 4E–G, 6–7 h after *Shh* transfection, we observed a clear up-regulation of *cyclin D1* on the electroporated side ($n = 19/20$). The effect was non-cell autonomous since, despite the fact that only a few cells misexpressed Shh, *cyclin D1*

transcripts were found to extend through the entire lateral wall of the neuroepithelium. *Cyclin D1* expression was not modified in embryos transfected in the same way with an empty vector ($n = 12$; data not shown). This effect was specific to *cyclin D1* since the presence of Shh-expressing cells in the dorsal region of the neural tube did not expand the domain of *cyclin D2* expression ($n = 0/17$) (Figs. 4H and I). Furthermore, Shh expression in the neural groove did neither lead to a down-regulation of *cyclin D2* (Fig. 4J). Together, these data show that Shh activity is sufficient to induce a premature activation of *cyclin D1* and does not modify *cyclin D2* expression. This suggests that *cyclin D1* is a specific target up-regulated by Shh in the neural groove.

The next step was to determine whether the initiation of *cyclin D1* expression in the preneural tube was Shh dependent. To address this question, we blocked the Shh signaling pathway by means of cyclopamine treatment (Incardona et al., 1998). We injected cyclopamine complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HBC) as a carrier or HBC alone in the neural tube and neural groove of stages 9–10 chicken embryos and analyzed the effect 6–12 h later. Cyclopamine injection resulted in a drastic reduction of the expression of Shh known target genes, such as *Gli1* ($n = 17/21$) (Figs. 5A–F). Likewise, a strong down-regulation of *cyclin D1* transcripts was observed in the neural groove-neural tube regions ($n = 26/29$) (Figs. 5G–L). Analysis of cross sections through these embryos confirmed the drastic effect of this treatment on the neuroepithelium (compare H with K and I with L). The staining in the paraxial mesoderm did not appear modified; however, taking into account the way cyclopamine was administered (injected with a carrier in the neural tube-neural groove), we cannot exclude the possibility that its diffusion was limited and that the inhibitor did not reach the paraxial mesoderm. The pan-neural marker *Sox2* was not significantly affected by cyclopamine treatment (data not shown), indicating that the effect on *cyclin D1* was not due to nonspecific toxicity. Finally, *cyclin D2*, whose expression persists in the caudal neural region during spinal cord elongation, was also unaffected by cyclopamine treatment ($n = 1/17$ embryo displaying a faint reduction of *cyclin D2* expression) (Figs. 5M–R).

Therefore, we propose that the initiation of *cyclin D1* in the neural groove is Shh dependent, whereas *cyclin D2* does not respond to this signaling pathway, at least in this region of the embryo.

The overexpression of cyclin D2 or D1 in the neural epithelium impedes neuronal differentiation while increasing the rate of proliferating neural progenitors

Attenuation of FGF signaling in the neural tube is a prerequisite for the initiation of neuronal differentiation (Diez del Corral et al., 2002). Since *cyclin D2* is part of the FGF posteriorizing activity and is known to facilitate G1 progression in the cell cycle, we hypothesized that one of

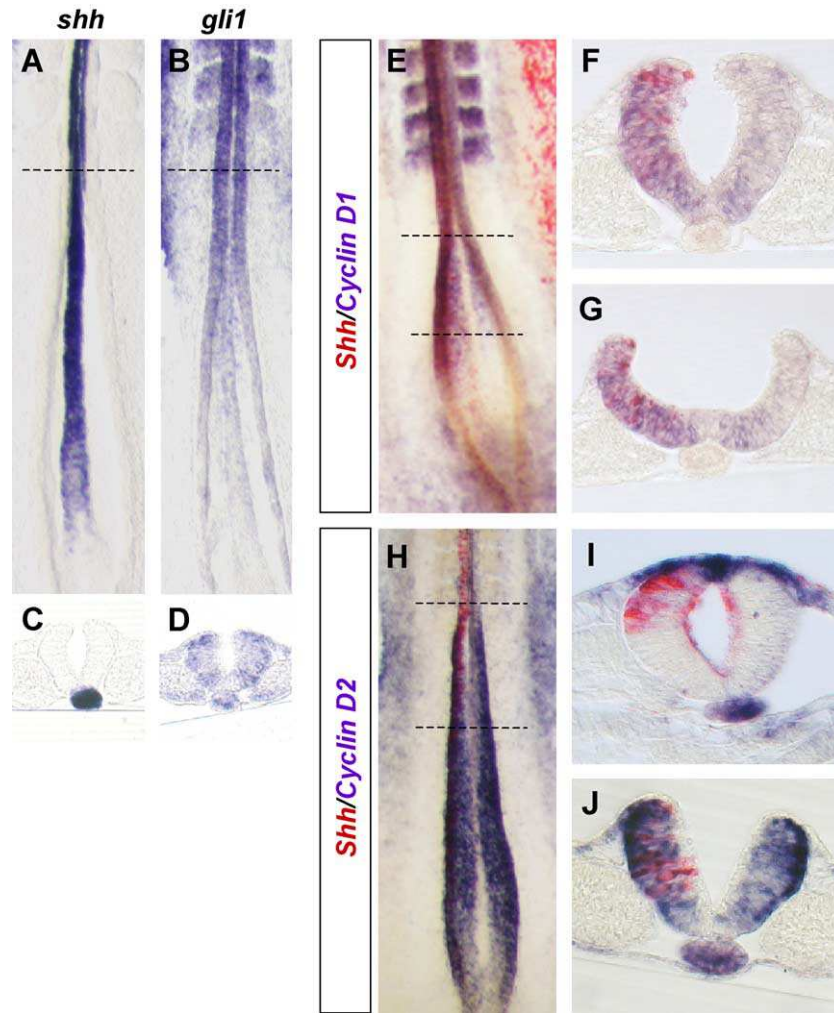


Fig. 4. Misexpressing *Shh* specifically up-regulates *cyclin D1* in the neural groove. (A–D) In situ hybridization to detect *Shh* (A and C) and an effector, the zinc-finger transcription factor *Gli1* (B and D), at the level of the neural groove in 10 somite stage embryos. (E–G) Misexpressing *Shh* in the neural groove leads within 6 h to an up-regulation of *cyclin D1*. The effect is non-cell autonomous since only a few expressing cells are sufficient to induce *cyclin D1* up-regulation throughout the electroporated neuroepithelium. (H–J) Misexpressing *Shh* in the neural groove has no effect on *cyclin D2* expression. Dashed lines indicate the levels of the cross sections.

the functions of *cyclin D2* is to keep neural progenitors in the cell cycle preventing them from differentiating. To test this hypothesis, we misexpressed *cyclin D2* in the neural tube and analysed neuronal differentiation using as markers the bHLH transcription factor *Math3/NeuroM* (referred to here as *NeuroM*), which is transiently expressed in differentiating neurons (Roztocil et al., 1997), and a neuron-specific β -tubulin isoform, TUJ1, characteristic of neuronal cells during or immediately after their final cell division. (Moody et al., 1989).

A *cyclin D2-IRES-GFP* expression construct was transfected by in ovo electroporation on the left side of the caudal neural plate preneural tube of HH stages 10–11 embryos. *NeuroM* expression was examined 6–24 h later, by which time the electroporated region had contributed to the neural tube, which expressed *NeuroM* on the contralateral side (Figs. 6A–F). *NeuroM* expression was clearly impeded in the *cyclin D2*-expressing domain in 12/17 of

the embryos (Figs. 6A and B). To further ascertain whether maintenance of *cyclin D2* affected neuronal differentiation, we analysed the expression of TUJ1. As shown in Figs. 6G and H, expression of *cyclin D2* in the neural tube dramatically reduced TUJ1 expression ($n = 11/15$). Together, these data show that the maintenance of *cyclin D2* in the neural tube interferes with neuronal differentiation.

We then wished to determine whether *cyclin D1* phenocopies *cyclin D2* effect on neuronal differentiation. To this end, misexpression experiments were performed in the same way with a *cyclin D1-IRES-GFP* expression construct. Again *NeuroM* ($n = 5/11$) (Figs. 6C and D) and TUJ1 ($n = 4/12$) (Figs. 6I and J) expression were inhibited. An empty vector had no significant effect on *NeuroM* or TUJ1 staining, which was reduced in 1/11 and 1/9 embryos, respectively (Figs. 6E, F, K, and L). A quantitative analysis performed on *NeuroM* expression 12 h after misexpressing

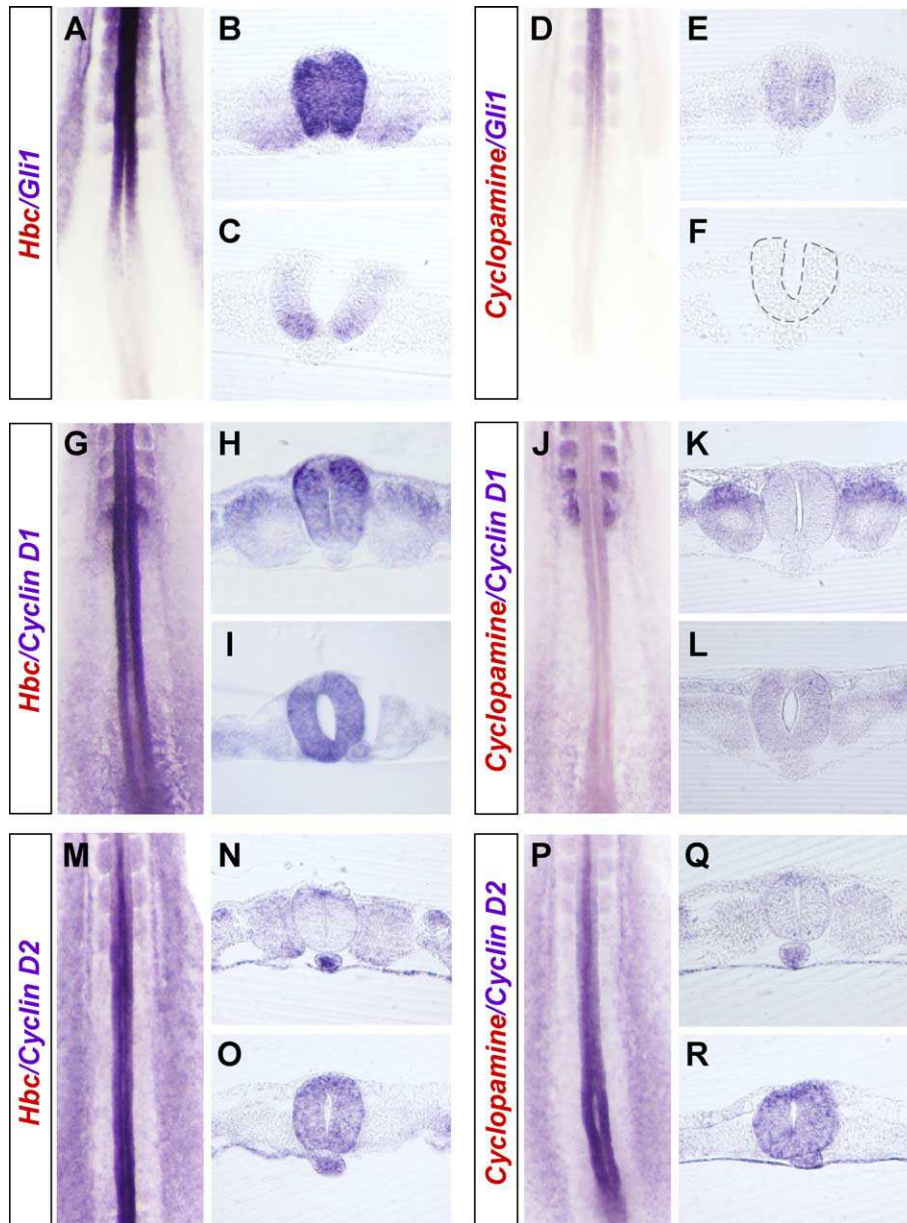


Fig. 5. Blocking Shh signaling specifically down-regulates *cyclin D1* expression. (A–F) In situ hybridization to reveal the expression of *Gli1*, a target gene of the Shh signaling pathway, in embryos treated with vehicle, HBC (A–C), or cyclopamine (D–F). Note the strong inhibition of *Gli1* expression in the experimental embryos. (A and D) Dorsal views of whole-mount 14 somite stage embryos. Cross sections are situated, respectively, at the somitic (B and E) and presomitic (C and F) levels of the corresponding whole-mount embryos. (G–L) In situ hybridization to reveal *cyclin D1* expression in control (treated with HBC; G–I) or cyclopamine-treated (J–L) embryos. Note the strong decrease of *cyclin D1* transcripts in the preneural tube and in the neural tube, including the most dorsal part. (G and J) Dorsal views of whole-mount 15–16 somite stage embryos. Cross sections are located, respectively, at the somitic (H and K) and presomitic (I and L) levels of the corresponding whole-mount embryos. (M–R) In contrast, cyclopamine treatment has no effect on *cyclin D2* expression. (M and P) Dorsal views of whole-mount 15 somite stage embryos. Cross sections are located, respectively, at the somitic (N and Q) and presomitic (O and R) levels of the corresponding whole-mount embryos.

either *cyclin D2* or *D1* (Fig. 6, histogram) confirms that both cyclins affect neuronal differentiation.

D-type cyclins are components of the core cell cycle machinery known to facilitate G1 phase progression. Therefore, overexpression of D-type cyclins may delay the onset of neuronal differentiation by increasing the rate of proliferating neural precursor cells, thus preventing cell cycle exit. To test this hypothesis, we misexpressed *cyclin D2* or

D1 in the neural tube and determined the rate of proliferating neural precursors. Misexpression experiments were performed in the same conditions as those described for *NeuroM* or *TUJ1* analyses. Taking advantage of the nuclear GFP, we quantified the percentage of electroporated cells incorporating the thymidine analogue BrdU. Embryos were treated for 30 min with BrdU, with such a short pulse, mainly cells in S-phase are detected (Murciano et al., 2002).

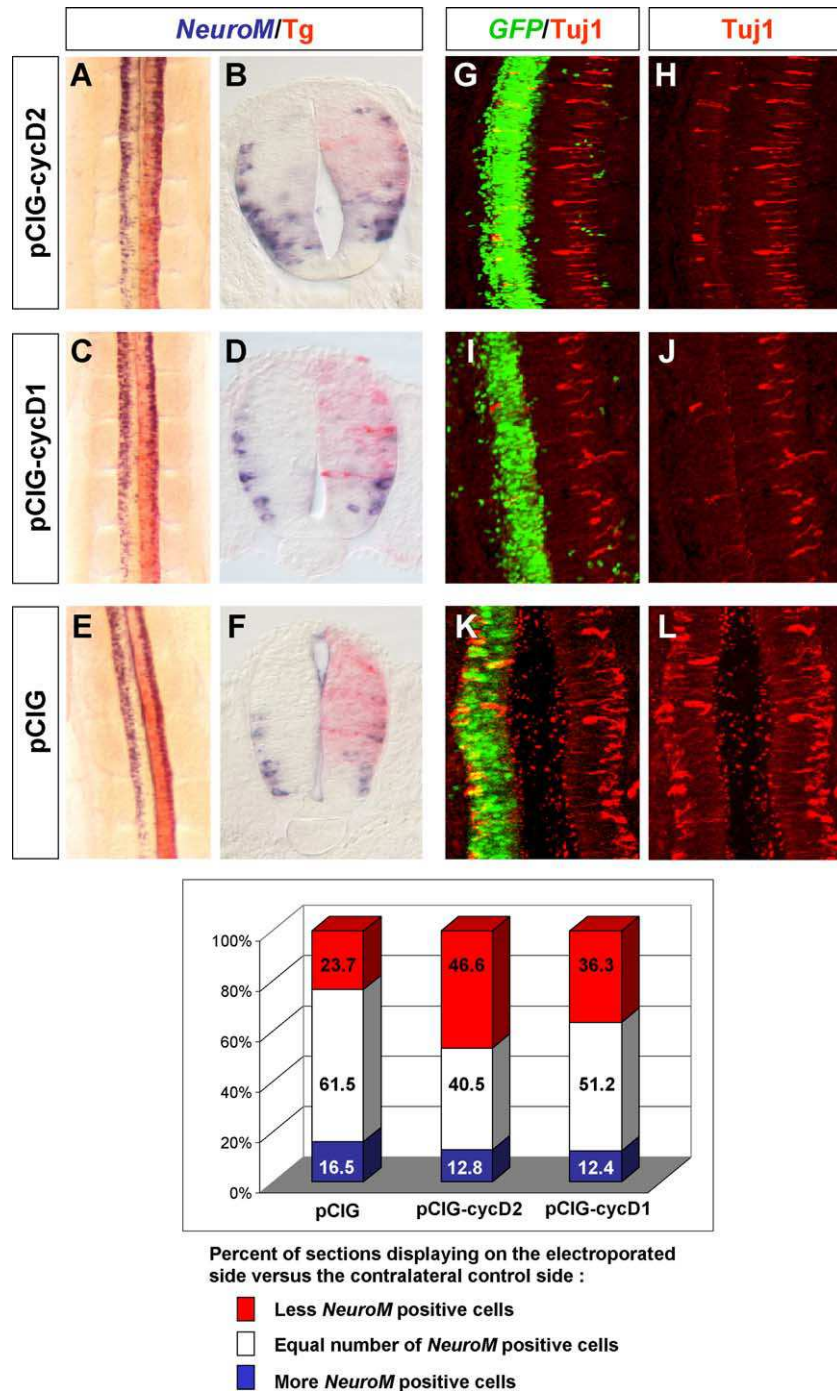


Fig. 6. Misexpressing *cyclins D1* and *D2* in the neural tube affects neuronal differentiation. (A–F) Double in situ hybridization showing the effect of in ovo electroporation of *cyclin D2* (A and B), *cyclin D1* (C and D), or the corresponding control vector (E and F) on *NeuroM* expression (*NeuroM* is in blue, the *cyclin* transgenes in red). Note that *NeuroM*-positive cells are virtually absent from the regions of *cyclin* misexpression. (A, C, and E) Dorsal views of whole-mount embryos. (B, D, and F) Cross sections, respectively, through A, C, and E. Three to four embryos were used for each treatment and the number of *NeuroM*-positive cells was counted on 10–34 sections per embryo. The histogram represents the mean percentage of sections containing fewer (red), equal numbers of (white), or more (blue) *NeuroM*-positive cells on the electroporated side compared with the contralateral control side. Note that in control embryos, the majority of the cross sections contains the same number of *NeuroM*-positive cells on both sides. Misexpressing *cyclins D2* or *D1* reduces the percentage of sections with the same number of *NeuroM*-positive cells on both sides and increases the percentage of those with less *NeuroM*-positive cells on the electroporated side. (G–L) Immunohistochemical demonstration, by confocal imaging in whole-mount embryos, of the consequences on Tuj1 expression (red) of misexpressing *cyclin D2* (G and H), *cyclin D1* (I and J), or an empty vector (K and L). The transgenic cells are labeled by nuclear-localized GFP. Maintaining the expression of either *cyclin* strikingly inhibits Tuj1 expression.

We also quantified the percentage of electroporated cells in mitosis by using an antibody against phospho-histone H3. These analyses were performed on cryostat sections from embryos displaying a reduction of TUJ1 immunostaining (data not shown).

In a population of neural progenitors electroporated with the empty vector (pCIG-IRES-GFP), 30% of the GFP-expressing cells are BrdU positives (Figs. 7A–C and J). Misexpressing cyclin D2 or D1 significantly increases this percentage up to 47.5% and 48%, respectively (Figs. 7D–I and J). These data show that maintenance of *cyclin D2* or *D1*

increase the rate of cells in S-phase, suggesting that these cyclins increase the rate of proliferating neural progenitors. To confirm this point, we quantified on adjacent cryostat sections the percentage of electroporated cells immunostained for phosphorylated histone H3 (P-H3) (data not shown). The population of cells electroporated with the empty vector include 2.5% (± 0.3 SEM) of P-H3-positive cells (Fig. 7K). The percentage raises to 5.6% (± 1 SEM) and 4.9% (± 0.4 SEM) in neural progenitors electroporated with *cyclin D2* or *D1*, respectively (Fig. 7K). Altogether, these data show that *cyclins D1* and *D2* increase the proliferation

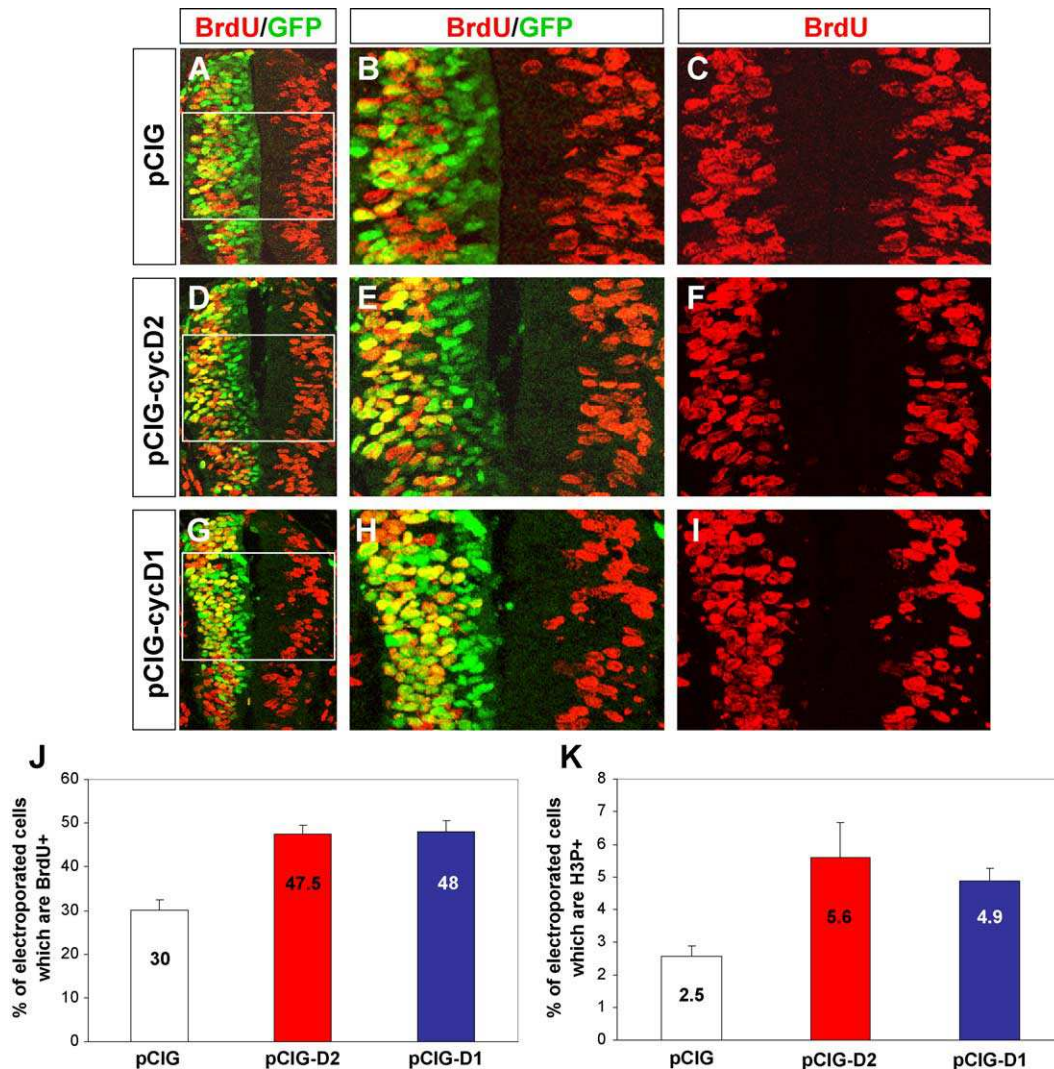


Fig. 7. Misexpressing *cyclin D1* or *D2* increases the rate of proliferating neural progenitors. (A–I) Embryos electroporated with a control vector (A–C), *cyclin D2* (D–F), or *cyclin D1* (G–I) were subjected to 30 min BrdU pulse labeling immediately before collection 24 h following electroporation. BrdU immunodetection (in red) was performed on 12 μ m transverse cryostat sections (A–I). B and C, E and F, and H and I show higher magnifications of the framed area in A, D, and G, respectively. Note that cells coexpressing BrdU and GFP (yellow) are clearly distinguishable from those expressing only GFP (green) in B, E, and H. (J and K) Quantification of the percentage of electroporated cells that are BrdU positive (J) or stained with anti-phospho-histone H3 (P-H3) (K) following *cyclin D2* (red bar), *cyclin D1* (blue bar), or the control vector (white bar) electroporation. For each marker, three embryos were used for each construct and cell count analysis was performed on four to five sections per embryos. Histogram represents the mean \pm SEM of the percentage of the electroporated cells, which are BrdU (J) or P-H3 (K) positive. In control embryos, 30% of the electroporated cells are BrdU positive. Misexpressing *cyclin D2* or *D1* increases this value up to 47.5% ($P < 0.01$, Student's *t* test) and 48% ($P < 0.01$, Student's *t* test), respectively. The percentage of electroporated cells P-H3 positive is also increased after *cyclin D2* or *D1* electroporation from 2.5% in control embryos to 5.6% ($P < 0.01$, Student's *t* test) and 4.9% ($P < 0.01$, Student's *t* test), respectively.

rate, suggesting that these molecules enforced neural progenitors to progress in G1 thus keeping them cycling.

Finally, given the redundant nature of *cyclins D* in mice (Ciemerych et al., 2002) and the fact that *cyclin D1* can act as a transcriptional regulator (for a review, see Coqueret, 2002), we checked whether *cyclin D2* is up- or down-regulated in response to *cyclin D1* overexpression and vice versa. Misexpressing *cyclin D1* or *D2* has no effect, respectively, on the endogenous level of *cyclins D2* and *D1* (data not shown), suggesting that the effects observed on neuronal progenitor cells do not reflect a cross-talk between these molecules.

Taken together, these data show that maintenance of *cyclin D2* or *D1* in the neural tube increases the proliferation rate and impedes neuronal differentiation. This suggests that their presence in the caudal neural plate and neural groove contributes to keep this neuroepithelial region in an immature proliferating state.

Discussion

In the present study, we show that a sequential expression of *cyclins D2* and *D1* accompanies the progressive maturation of the spinal cord primordium in chicken embryo. *Cyclin D2* is strongly expressed in the immature caudal neural plate, whereas *cyclin D1* transcripts appear later on in the maturing neural groove, where *cyclin D2* declines. Transcription of *cyclins D1* and *D2* is regulated by signaling pathways involved in the control of the maturation and specification of the neural progenitor cells. The FGF signaling pathway is required to maintain *cyclin D2* expression in the caudal neural plate while blocking *cyclin D1* activation. In the maturing neural groove, only *cyclin D1* up-regulation depends on Shh signaling. In misexpression experiments, we found that *cyclins D1* and *D2* both favor cell cycle progression and prevents neural differentiation.

Maintenance of the G1 cell cycle regulator, cyclin D2, in the caudal neural plate is part of the FGF8 posteriorizing program

Several FGFs, including FGF8, are expressed in the posterior region of vertebrate embryos (Bertrand et al., 2000; Crossley and Martin, 1995), and posterior development is impaired in mice with hypomorphic alleles of *fgf8* (Meyers et al., 1998). Consequently, it has been proposed that FGF signaling promotes the continuous development of the posterior nervous system by maintaining a pool of neural progenitors in the region of Hensen's node in a "stem cell" status (Mathis et al., 2001). As previously described (see Introduction), the FGF-dependent immature state is characterized by high mobility of neural progenitor cells, expression of a specific combination of transcription factors, and absence of neuronal differentiation (Bertrand et al., 2000; del Corral et al., 2003; Diez del Corral et al., 2002; Mathis et al.,

2001; Novitch et al., 2003; Stern et al., 1991; Storey et al., 1998). Here, we have shown that FGF signaling maintains *cyclin D2* expression in the immature caudal neural plate, integrating this G1-phase regulator in the FGF posteriorizing program (cf. Fig. 8). We observe that deleting the mesoderm has no effect on the most caudal *cyclin D2* expression possibly because the caudal neural plate expresses itself high levels of FGF8. *Wnt3a*, known to positively regulate *cyclin D2* (Megason and McMahon, 2002) and which is expressed in the caudal region of the embryo (Cauthen et al., 2001), may also contribute to maintain *cyclin D2*.

The FGF signaling pathway has previously been implicated in the control of proliferation in different encephalic regions (Dono, 2003). For example, FGF2 increases the proportion of dividing cells in embryonic rat cortex, thereby leading to an increase in the size of the adult cerebral cortex (Vaccarino et al., 1999). FGF8 and FGF17 regulate proliferation and differentiation of mouse midline cerebellar structures (Xu et al., 2000). Disrupting the *fgf17* gene decreases precursor cell proliferation in the medial cerebellar anlage, a phenotype enhanced by loss of a copy of *fgf8*. Interestingly, the premature decrease of FGF signaling in these mutant embryos results in an accelerated rostromedial progression of Purkinje cell differentiation. In the caudal spinal cord primordium, neural progenitor cells are mitotically active and do not differentiate (Diez del Corral et al., 2002; Sechrist and Bronner-Fraser, 1991). FGF signaling maintains *cyclin D2* expression in the caudal neural plate region, and cyclin D-cdk4/6 complexes have been classically described to promote early G1 cell cycle progression, a function relevant to the preservation of a proliferative domain. Accordingly, the *cdk6* kinase is expressed in the caudal neural plate and neural groove regions (B.B., unpublished observation). Forced expression in the neural tube of a dominant-negative form of *cyclin D1*, which forms abortive complexes with cdk4/6 and thus titrates these kinases, has been shown to reduce the expansion of neural progenitors (Megason and McMahon, 2002). We show here that maintenance of *cyclin D2* in neural progenitors increases the rate of proliferation while restraining neuronal differentiation. Therefore, it is tempting to suggest that in the caudal neural plate region, *cyclin D2* is an effector of the FGF-dependent immature state by maintaining spinal progenitors in the cell cycle.

Activation of the G1 cell cycle regulator, cyclin D1, in the neural groove depends upon Shh activity

Shh has previously been shown to promote cell proliferation via cyclin D up-regulation in several regions of the CNS (Ruiz et al., 2002). Shh acts as a mitogen for cerebellar granule cell precursors (Dahmane and Ruiz-i-Altaba, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999) and *cyclins D1* and *D2* are transcriptional targets mediating this mitogenic response (Dahmane and Ruiz-i-Altaba, 1999; Kenney and Rowitch, 2000; Kenney et al., 2003; Oliver et al., 2003;

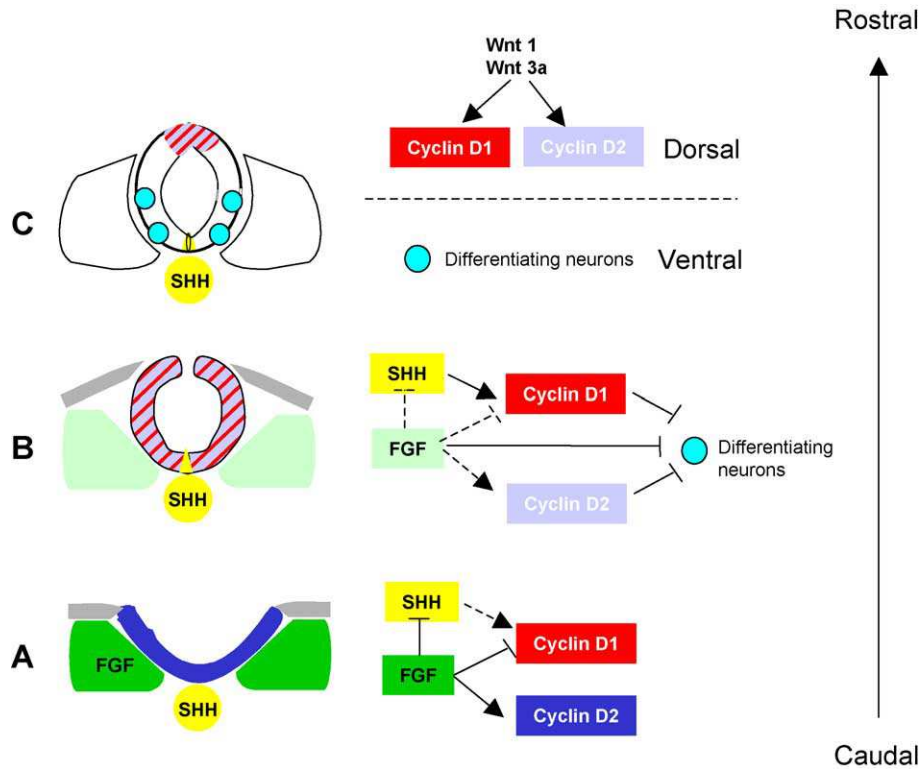


Fig. 8. Integrating cell cycle regulators in a model for the maturation of the spinal cord primordium. (A) In the caudal neural plate, FGF signaling maintains expression of *cyclin D2* and restrains that of *cyclin D1*, directly or indirectly via down-regulation of Shh signaling (del Corral et al., 2003), thereby helping to keep this region in an immature state. (B) In the neural groove, attenuation of FGF signaling has two consequences: activation of *cyclin D1* expression, which depends on Shh, and diminution of *cyclin D2* expression. Experimentally prolonging expression of *cyclins D2* and *D1* inhibits neural differentiation. (C) After neural tube closure, both cyclins are excluded from all but the most dorsal region of the neural tube, where they are possibly controlled by Wnt signaling (Megason and McMahon, 2002). This restriction to the dorsal neural tube may contribute to the initiation of neuronal differentiation.

Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Loss of Shh function impedes the growth of both ventral and dorsal regions of diencephalon and midbrain by affecting proliferation in the corresponding primordia in early somite stage embryos (Britto et al., 2002; Ishibashi and McMahon, 2002). These growth defects are associated with down-regulation of *cyclin D1* expression (Britto et al., 2002; Ishibashi and McMahon, 2002). In these regions, it has been proposed that Shh regulates *cyclin D1* by inducing relay signaling pathways that enhance the competence of dorsal neural progenitors to respond to dorsally secreted Wnt. We have observed that initiation of *cyclin D1* expression in the neural groove depends on Shh. However, unlike classical Shh target genes, which are found in the ventral half of the neural tube, *cyclin D1* is rapidly restricted to the dorsal-most part of the neural tube. This dorsal expression of *cyclin D1* is apparently dependent upon Shh activity since cyclopamine treatment resulted in the disappearance of *cyclin D1* transcripts throughout the neural tube. One interpretation is that the dorsal expression of *cyclin D1* involves a relay signaling pathway. A good candidate for such a role is the Wnt/ β catenin signaling pathway. Indeed, *Wnt1* and *Wnt3a* both appear in the dorsal region of the closing neural tube at the right time (Cauthen et al., 2001), and this signaling pathway is known to control the growth

of this region, in part, through transcriptional regulation of *cyclins D1* and *D2* (Megason and McMahon, 2002).

In the vertebrate neural tube, the secreted protein Shh is also crucial for the specification of ventral neuronal subtypes (Briscoe et al., 2000). Shh acts as a morphogen on ventral neural progenitors (Briscoe et al., 2000). Each ventral neuronal subtype arises from a specific progenitor domain defined by a precise combinatorial expression of homeodomain (HD) proteins. Two sets of HD proteins have been distinguished on the basis of their response to the Shh signaling pathway: class I (Pax7, Pax6, Dbx1/2, and Irx3) and class II (Nkx6 and Nkx2) proteins, which are repressed and activated by Shh, respectively. These transcription factors, which sign the onset of ventralization, appear in the neural groove when the caudal transcriptional program terminates. Indeed, FGF signaling exerts a potent repressive effect on the class I HD proteins such as Pax6 and Irx3 (Bertrand et al., 2000; del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003) and a weaker repression of class II HD proteins (del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003), thus preventing the caudal neural plate from expressing the ventralizing program prematurely. Here we show that in the neural groove, the FGF signaling pathway weakly represses *cyclin D1* expression and that its activation is Shh dependent, a mechanism of regulation reminiscent of class II HD proteins

(cf. Fig. 8). The effect of FGF on *cyclin D1* may be indirect since FGF signaling has been shown to inhibit Shh activity (del Corral et al., 2003). Hence, the embryo may keep one of the G1 cell cycle regulators, *cyclin D1*, specifically under the control of Shh to coordinate the proliferation and patterning of the neural tube along the dorsoventral axis.

Controlling the balance between cell cycle progression and differentiation via regulation of cyclins D1 and D2

Here we show that *cyclin D2* is specifically up-regulated by FGF signaling, while only *cyclin D1* responds to Shh signaling. This suggests that the embryo may control cell cycle progression in discrete domains by regulating individual *cyclins D* via distinct signaling pathways. Is this specific regulation merely to ensure the function of no matter which cyclin D on time, or does it reflect the requirement for distinctive functions characteristic of each cyclin? That *cyclins D* may have redundant functions is already suggested by two observations. Firstly, in the mouse embryo, *cyclin D1* is predominantly expressed in the caudal neural plate, whereas *cyclin D2* appears in the neural tube, suggesting that these cyclins are interchangeable in this particular region in mouse and chick (Wianny et al., 1998). Secondly, in mice expressing a single D-type cyclin, the remaining one was found to be activated in the expression domain of the missing cyclins, the only condition being to have the machinery to up-regulate it (Ciemerych et al., 2002). The fact that cyclins D1 and D2 increased the proliferation rate and inhibited neuronal differentiation in our experiments suggest that both cyclins are, at least in part, redundant in function.

In our misexpression experiments, both cyclin D favor cell cycle progression while preventing neuronal differentiation. However, neural progenitor cells that withdraw from the cell cycle appear in the neural groove concomitantly with *cyclin D1* activation (Henrique et al., 1995; Sechrist and Bronner-Fraser, 1991) and at later stages of spinal cord development, in neural progenitors domains that express *cyclin D1* and/or *cyclin D2* (Megason and McMahon, 2002; V.L., unpublished observations). Cyclin-cdk complexes are negatively regulated by cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI). Two classes of CKIs promote cell cycle exit by reducing the amount of CDK activity in G1: the INK4 family (inhibitors of CDK4) specifically bind monomeric CDK4/6 preventing cyclin D activation; the Cip/Kip family members display a more broadly spectrum of inhibitory activities binding several heterodimeric cyclin D-, E-, and A-CDKs complexes (for reviews, see Ho and Dowdy, 2002; Sherr and Roberts, 1999). Certain of these molecules have been shown to play a key role coordinating cell cycle exit and neural differentiation (for reviews, see Cunningham and Roussel, 2001; Galderisi et al., 2003; Ohnuma and Harris, 2003; Ohnuma et al., 2001). One possibility is that during spinal cord maturation, these CKIs appear in the neural groove and persist in later stages of spinal cord development explaining why neural progenitor cells begin to exit the cell

cycle in the cyclin D domain. In our *cyclin D* overexpression experiments, the CKIs effect is probably bypassed by the accumulation of active cyclinD/CDK4/6 complexes, favoring cell cycle progression rather than neural differentiation. The balance between positive and negative regulators of G1 progression has to be tightly controlled to maintain a sufficient pool of progenitors while allowing neuronal differentiation to proceed in time. Here we showed how the embryos maintain proliferating neural progenitors in discrete domains; the challenge is now to integrate the negative regulators of the G1 progression contributing to neural differentiation in the maturing spinal cord.

Acknowledgments

The authors are particularly grateful to J.M. Lahti and V.J. Kidd for the gift of full-length cDNA coding for chicken *cyclins D1* and *D2*. We would like to thank C. Danesin and Drs. A. McMahon, T. Roztocil, and C. Tabin for the gift of plasmids. Many thanks to B. Ronsin for excellent technical assistance. We thank Drs. E. Agius, S. Bel-Vialar, B. Ducommun, J. Smith, and A. Vincent for their comments on the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, le Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche, la Fondation pour la Recherche Médicale, and l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

References

- 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.
- Bertrand, N., Medevielle, F., Pituello, F., 2000. FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development* 127, 4837–4843.
- 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.
- Britto, J., Tannahill, D., Keynes, R., 2002. A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain. *Nat. Neurosci.* 5, 103–110.
- Catala, M., Teillet, M.A., De Robertis, E.M., Le Douarin, M.L., 1996. A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 122, 2599–2610.
- Cauthen, C.A., Berdugo, E., Sandler, J., Burrus, L.W., 2001. Comparative analysis of the expression patterns of Wnts and Frizzleds during early myogenesis in chick embryos. *Mech. Dev.* 104, 133–138.
- Ciemerych, M.A., Kenney, A.M., Sicinska, E., Kalaszczynska, I., Bronson, R.T., Rowitch, D.H., Gardner, H., Sicinski, P., 2002. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev.* 16, 3277–3289.
- Coqueret, O., 2002. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299, 35–55.
- Crossley, P.H., Martin, G.R., 1995. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121, 439–451.

- Cunningham, J.J., Roussel, M.F., 2001. Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ.* 12, 387–396.
- Dahmane, N., Ruiz-i-Altaba, A., 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089–3100.
- 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.
- Diez del Corral, R., Breikreuz, 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.
- Dono, R., 2003. Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* 284, R867–R881.
- Galderisi, U., Jori, F.P., Giordano, A., 2003. Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22, 5208–5219.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn.* 195, 231–272.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., Ish-Horowitz, D., 1995. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787–790.
- Henrique, D., Tyler, D., Kintner, C., Heath, J.K., Lewis, J.H., Ish-Horowitz, D., Storey, K.G., 1997. *Cash4*, a novel achaete-scute homolog induced by Hensen's node during generation of the posterior nervous system. *Genes Dev.* 11, 603–615.
- Ho, A., Dowdy, S.F., 2002. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 47–52.
- Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P., Roelink, H., 1998. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125, 3553–3562.
- Ishibashi, M., McMahon, A.P., 2002. A sonic hedgehog-dependent signaling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo. *Development* 129, 4807–4819.
- Itasaki, N., Bel-Vialar, S., Krumlauf, R., 1999. 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nat. Cell Biol.* 1, E203–E207 (java/Propub/cellbio/ncb1299_E203.fulltext java/Propub/cellbio/ncb1299_E203.abstract).
- Kennedy, A.M., Rowitch, D.H., 2000. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9055–9067.
- Kennedy, A.M., Cole, M.D., Rowitch, D.H., 2003. *Nmyc* up-regulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* 130, 15–28.
- Langman, J., Haden, C.C., 1970. Formation and migration of neuroblasts in the spinal cord of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 138, 419–425.
- Le Douarin, N.M., Teillet, M.A., Catala, M., 1998. Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 909–916.
- 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.
- 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.
- McConnell, J.A., Sechrist, J.W., 1980. Identification of early neurons in the brainstem and spinal cord: I. An autoradiographic study in the chick. *J. Comp. Neurol.* 192, 769–783.
- Megason, S.G., McMahon, A.P., 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129, 2087–2098.
- Meyers, E.N., Lewandoski, M., Martin, G.R., 1998. An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* 18, 136–141.
- Moody, S.A., Quigg, M.S., Frankfurter, A., 1989. Development of the peripheral trigeminal system in the chick revealed by an isotype-specific anti-beta-tubulin monoclonal antibody. *J. Comp. Neurol.* 279, 567–580.
- Murciano, A., Zamora, J., Lopez-Sanchez, J., Frade, J.M., 2002. Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 285–300.
- Nornes, H.O., Carry, M., 1978. Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis. *Brain Res.* 159, 1–6.
- Nornes, H.O., Das, G.D., 1974. Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord of rat: I. An autoradiographic study-time and sites of origin and migration and settling patterns of neuroblasts. *Brain Res.* 73, 121–138.
- 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.
- Ohnuma, S., Harris, W.A., 2003. Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 40, 199–208.
- Ohnuma, S., Philpott, A., Harris, W.A., 2001. Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 66–73.
- Oliver, T.G., Grasdeder, L.L., Carroll, A.L., Kaiser, C., Gillingham, C.L., Lin, S.M., Wickramasinghe, R., Scott, M.P., Wechsler-Reya, R.J., 2003. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for *N-myc* in proliferation of neuronal precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7331–7336.
- Pituello, F., Yamada, G., Gruss, P., 1995. Activin A inhibits Pax-6 expression and perturbs cell differentiation in the developing spinal cord in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 6952–6956.
- Pituello, F., Medevielle, F., Foulquier, F., Duprat, A.M., 1999. Activation of Pax6 depends on somitogenesis in the chick embryo cervical spinal cord. *Development* 126, 587–596.
- Roztocil, T., Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Ballivet, M., Matter, J.M., 1997. *NeuroM*, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. *Development* 124, 3263–3272.
- Ruiz, I.A.A., Palma, V., Dahmane, N., 2002. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 24–33.
- Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., 1991. Birth and differentiation of reticular neurons in the chick hindbrain: ontogeny of the first neuronal population. *Neuron* 7, 947–963.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
- Smith, J.L., Schoenwolf, G.C., 1997. Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* 20, 510–517.
- Spann, P., Ginsburg, M., Rangini, Z., Fainsod, A., Eyal-Giladi, H., Gruenbaum, Y., 1994. The spatial and temporal dynamics of *Sax1* (*CHox3*) homeobox gene expression in the chick's spinal cord. *Development* 120, 1817–1828.
- Stern, C.D., Jaques, K.F., Lim, T.M., Fraser, S.E., Keynes, R.J., 1991. Segmental lineage restrictions in the chick embryo spinal cord depend on the adjacent somites. *Development* 113, 239–244.
- Storey, K.G., Goriely, A., Sargent, C.M., Brown, J.M., Burns, H.D., Abud, H.M., Heath, J.K., 1998. Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. *Development* 125, 473–484.
- Vaccarino, F.M., Schwartz, M.L., Raballo, R., Nilsen, J., Rhee, J., Zhou, M., Doetschman, T., Coffin, J.D., Wyland, J.J., Hung, Y.T., 1999. Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat. Neurosci.* 2, 246–253.
- Wallace, V.A., 1999. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr. Biol.* 9, 445–448.
- Walshe, J., Mason, I., 2000. Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during early neural development in the chick embryo. *Mech. Dev.* 90, 103–110.
- Wechsler-Reya, R.J., Scott, M.P., 1999. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103–114.
- Wianny, F., Real, F.X., Mummery, C.L., Van Rooijen, M., Lahti, J., Samarut, J., Savatier, P., 1998. G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev. Dyn.* 212, 49–62.
- Xu, J., Liu, Z., Ornitz, D.M., 2000. Temporal and spatial gradients of *Fgf8* and *Fgf17* regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* 127, 1833–1843.

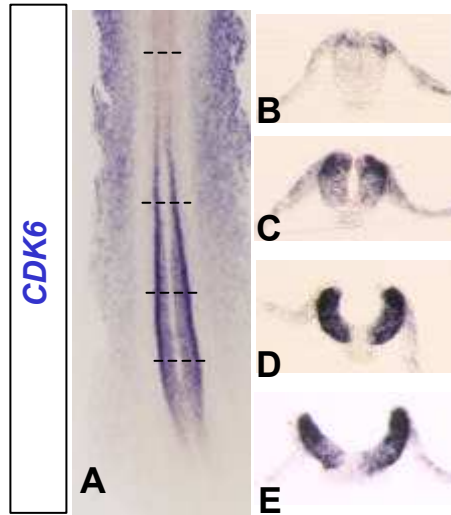


Figure 17 : Patron d'expression de *CDK6* au cours de la maturation de la moelle épinière.

Analyse par hybridation *in situ* de la répartition des transcrits codant *CDK6* sur un embryon au stade 9 somites (A): région caudale en vue dorsale. (B-E): Coupes transversales aux niveaux indiqués par les tirets en A. *CDK6* est fortement exprimé dans la plaque et la gouttière neurale au stade HH 9-10.

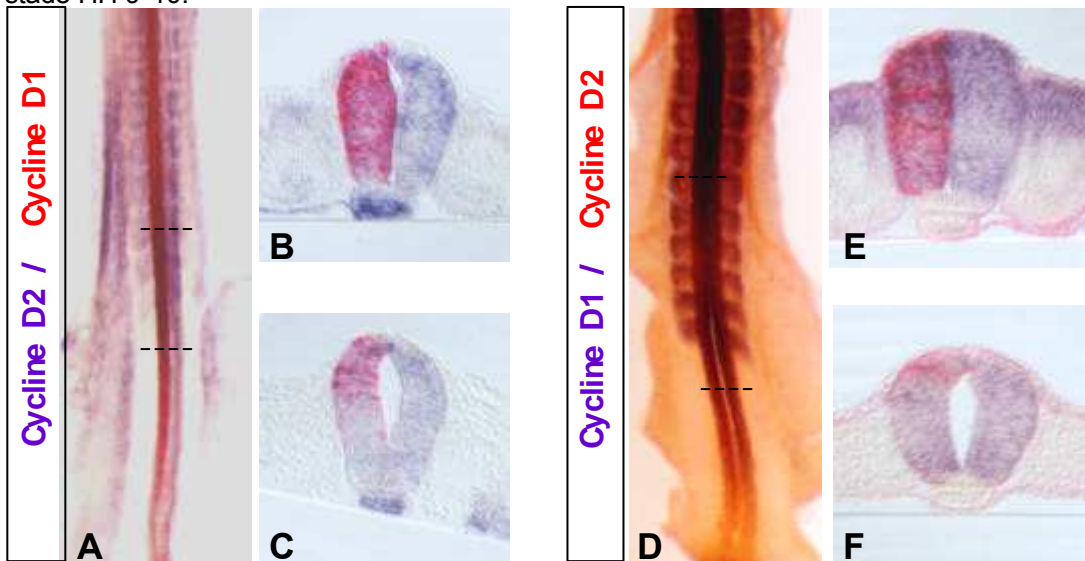


Figure 18 : Analyse de la surexpression des Cyclines D1 sur l'expression de *Cycline D2* et de la surexpression de la *Cycline D2* sur l'expression de *Cycline D1*.

La surexpression est réalisée par électroporation au stade 10 HH sur une durée de 12 heures, l'analyse de fait par double hybridation *in situ*. (A-C) L'expression de *Cycline D2* (violet) n'est pas altérée dans les conditions de surexpression de la *Cycline D1* (rouge). (D-F) L'expression de *Cycline D1* (violet) n'est pas altérée dans les conditions de surexpression de la *Cycline D2* (rouge). B,C et E,F sont les coupes transversales au niveau des tirets re présentés sur les vues dorsales respectivement en A et D.

C/ Résultats supplémentaires liés au premier article.

a) Recherche des kinases dépendantes des Cyclines D exprimées dans l'ébauche de moelle épinière.

Les Cyclines D constituent les unités régulatrices des complexes kinases dépendantes des Cyclines (CDK) CDK4,6 /Cycline D (Ho and Dowdy, 2002). Le rôle des Cyclines D dans ce contexte n'est donc envisageable qu'en présence d'un partenaire CDK correspondant. Chez le poulet nous n'avons identifié à l'heure actuelle qu'un orthologue de *CDK6*.

Nous avons donc recherché à savoir si cette kinase est co-exprimée avec les Cyclines D2 et D1 dans l'ébauche de moelle épinière. Le marquage obtenu par hybridation *in situ* sur un embryon d'environ stade 10HH montre que *CDK6* est fortement exprimé dans la partie caudale du neuroépithélium à l'exception de la ligne médiane ventrale (figure 17). L'analyse sur coupes confirme que le transcrite est présent à un niveau élevé au niveau de la plaque et de la gouttière neurale. Au niveau du pré-tube neural *CDK6* est exprimé selon un gradient dorso-ventral décroissant. Dans le tube neural l'expression de *CDK6* est restreinte aux parties les plus dorsales du neuroépithélium (figure 17 B-E). Ainsi le transcrite codant *CDK6* est présent dans la plaque, la gouttière neurale et le pré-tube neural.

Ces données montrent que *CDK6* est co exprimé avec les *Cyclines D1* et *D2* suggérant que les complexes CDK6/Cyclines D pourraient être actifs dans l'ébauche de moelle épinière.

b) Analyse de l'influence de la fonction des Cyclines D1 et D2 sur leur propre expression.

Des données montrent qu'en plus de son rôle sur le cycle cellulaire via les complexes CDK/Cyclines, la Cycline D1 peut agir comme un régulateur de la transcription (Coqueret, 2002). Afin de savoir si l'effet de la Cycline D1 sur la prolifération et la différenciation des précurseurs neuraux pouvait être du à une modification de l'expression de la *Cycline D2*, nous avons analysé l'effet de la surexpression de la Cycline D1 sur l'expression de la Cycline D2 et vice versa.

Nous avons d'abord analysé l'expression de *Cycline D2* après 12 heures de surexpression de la Cycline D1 dans le tube neural d'un embryon de poulet au stade 10 HH. L'analyse par hybridation *in situ* ne montre pas de différence d'expression de la Cycline D2 malgré le taux important de transgène exprimé du coté électroporé (n=9) (figure 18 A-C). La

Cycline D1 n'affecte donc pas l'expression de la Cycline D2 dans nos conditions expérimentales. De manière similaire, la surexpression de la Cycline D2 n'a pas d'effet sur l'expression de la Cycline D1 (n=8) (Figure 18 D-F).

Ces résultats montrent que l'effet de la surexpression des Cyclines D sur la prolifération et la différenciation des précurseurs neuraux ne semble pas être dû à des régulations croisées entre ces molécules.

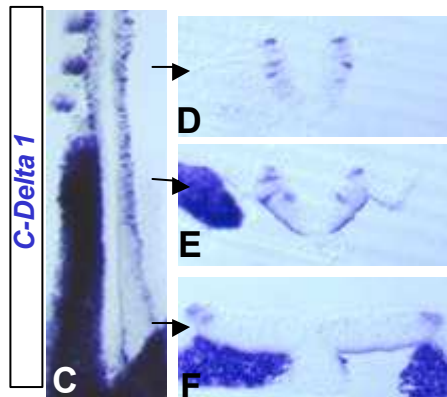
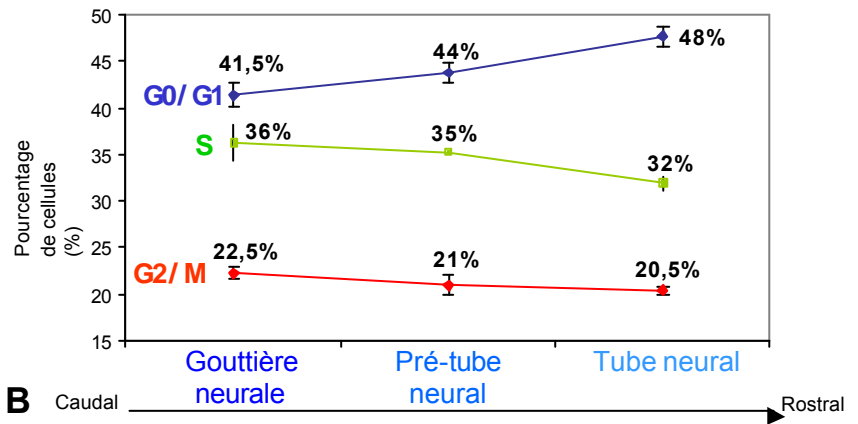
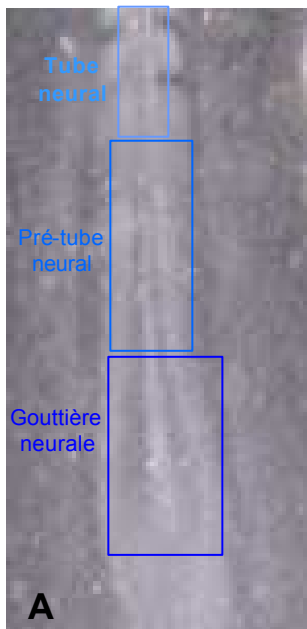


Figure 19 : Analyse par cytométrie de flux de la répartition des précurseurs neuraux dans les différentes phases du cycle cellulaire au cours de la maturation du neuroépithélium.

A) Des explants de gouttière neurale, pré-tube et tube neural ont été prélevés sur des embryons de stade HH 9-10 et analysés en cytométrie de flux.

B) Représentation graphique en courbes des résultats de l'analyse en cytométrie de flux. La maturation du neuroépithélium s'accompagne d'une augmentation du pourcentage de cellules en G0/G1 au dépend des phases S et G2/M.

C-F) Expression de *C-Delta 1* analysée par hybridation *in situ* sur un embryon de 7 somites. C) Région caudale en vue dorsale. Le mésoderme présomitique fortement marqué a été éliminé du côté droit. (D-F): Coupes transversales aux niveaux indiqués par les flèches en C. Les premières cellules post-mitotiques apparaissent au niveau du pré-tube neural.

c) Evolution des paramètres du cycle cellulaire au cours de la maturation du neuroépithélium.

Afin de savoir si l'expression régionalisée des *Cyclines D1* et *D2* pouvait être corrélée avec un comportement prolifératif particulier dans l'ébauche de moelle épinière nous avons procédé à des marquages des cellules en phase S (incorporation de BrdU sur des temps courts) ou des marquages des cellules mitotiques. Ces analyses réalisées à des stades 9-10 HH n'ont pas permis de mettre en évidence de variation nette de comportement prolifératif en relation avec les domaines d'expression des *Cyclines D1* ou *D2* (Valérie Lobjois, résultats non montrés).

Pour affiner notre analyse et savoir s'il existait des différences de comportement des cellules dans le cycle entre les régions de la gouttière neurale, du pré-tube neural et du tube neural, nous avons décidé de mener cette étude sur un plus grand nombre de cellules. La mise au point d'un protocole d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux à partir d'explants de neuroépithélium nous a permis d'étudier la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de la maturation de l'ébauche de moelle épinière. Ainsi nous avons disséqué des explants de gouttière neurale, de pré-tube neural, et de tube neural (figure 19A). Nous avons par la suite analysé en cytométrie de flux le contenu en ADN correspondant à chaque cellule et par conséquent nous avons pu savoir la proportion de cellules dans chaque phase du cycle pour chacun des échantillons. Pour chaque région, deux analyses indépendantes ont été réalisées sur environ 10 000 cellules provenant d'explants de 4 ou 5 embryons de stade 10 HH. Les analyses révèlent qu'il existe des différences entre chaque région mais que ces différences sont faibles. Dans la gouttière neurale 41,5% des cellules sont en phase G1 ou G0, 36% des cellules sont en phase S et 22.5% des cellules sont en phase G2 ou M; dans le pré-tube neural 44% des cellules sont en phase G1 ou G0, 35% sont en phase S et 21% en phase G2 ou M; enfin dans le tube neural 48% des cellules sont en phase G1 ou G0, 32% sont en phase S et 20.5% sont en phase G2 ou en mitose (figure 19B). Au fur et à mesure de la maturation du neuroépithélium on observe donc une augmentation de la proportion des cellules en G0/G1, une légère diminution de la proportion des cellules en phase S et une très légère diminution de la proportion des cellules en phase G2 et M. Ces résultats peuvent suggérer qu'au fur à mesure de la maturation de l'ébauche de moelle épinière on observe un allongement de la phase G1 et/ou une réduction des phases S et G2/M. L'étude du marqueur post-mitotique Delta 1 montre que les premières cellules qui sortent du

cycle cellulaire se situent au niveau du pré-tube neural et le nombre de cellules post mitotiques augmente au niveau du tube neural (figure 19 C-F). L'apparition de cellules post mitotiques au niveau du pré-tube neural et du tube neural pourrait donc participer à la diminution des phases S et G2/M au profit de la phase G0/G1. Ainsi le fait que nous ne puissions pas intégrer les cellules qui sont sorties du cycle cellulaire à notre étude nous empêche d'avoir une vision précise des paramètres de prolifération des précurseurs neuraux.

Ces données suggèrent néanmoins qu'une évolution très progressive du comportement dans le cycle cellulaire des précurseurs neuraux ait lieu au cours de la maturation du neuroépithélium. Au niveau du pré-tube puis du tube neural nous observons une augmentation graduelle des cellules en G0/G1 qui peut être corrélée avec l'apparition des premiers neurones postmitotiques. Dans ce même contexte nous savons que l'expression des *Cyclines D* est restreinte à la partie dorsale du tube neural. Ces observations sont en faveur du modèle proposé dans l'article: la restriction dorsale des *Cyclines D1* et *D2* dans le tube neural pourrait donc permettre à certains précurseurs neuraux de sortir du cycle cellulaire puis de se différencier.

II/ Shh régule l'expression d'un régulateur de la transition G2/M dans l'ébauche de moelle épinière : la phosphatase CDC25B.

A/ Synthèse de l'article.

Pour identifier d'autres acteurs qui pourraient participer au contrôle de la prolifération dans l'ébauche de moelle épinière nous avons analysés par hybridation *in situ* le patron d'expression des principaux régulateurs du cycle cellulaire. Nous avons obtenu des résultats particulièrement intéressants concernant les phosphatases CDC25. Chez les Vertébrés il existe 3 gènes qui codent pour des phosphatases de type CDC25: CDC25A, CDC25B et CDC25C. Chez le poulet nous n'avons identifié que deux gènes orthologues respectivement de CDC25A et CDC25B. L'analyse de l'expression et de la régulation de ces gènes fait l'objet de cet article. La phosphatase CDC25B est connue pour promouvoir la transition G2/M en activant le complexe CDK1/Cycline B. CDC25A a un rôle plus général agissant à la fois à la transition G1/S et au contrôle de la G2/M. De manière intéressante nous avons mis en évidence que le transcrit *CDC25B* est présent dans les zones où la signalisation Shh est active au cours du développement embryonnaire. En effet, chez le poulet ce gène est exprimé de façon asymétrique au niveau du nœud de Hensen, en gradient ventro-dorsal décroissant dans la gouttière neurale et enfin dans la partie postérieure du bourgeon de membre, trois zones sous influence de Shh. Contrairement à *CDC25B*, l'expression des autres régulateurs de la transition G2/M n'est pas corrélée avec des zones d'activité de la voie Shh. Ainsi dans un embryon de poulet de 1.5 jours de développement *CDK1* est exprimé de manière ubiquitaire et *CDC25A* est exprimé selon un gradient dorso-ventral décroissant dans le tube neural soit de manière complémentaire à *CDC25B*.

Des expériences de gain et de perte de fonction dans le tube neural nous ont permis de montrer que la signalisation Shh régule positivement l'expression de *CDC25B* alors qu'elle a peu ou pas d'effet sur *CDC25A* dans cette structure. Compte tenu que CDC25B est présent dans plusieurs zones d'activité Shh nous avons voulu vérifier si cette voie de signalisation contrôlait aussi l'expression de ce gène dans d'autres sites embryonnaires que le tube neural. L'expression de *CDC25B* est absente des bourgeons de membres d'embryons de souris *Shh* -/- et la greffe de cellules qui expriment Shh dans la partie antérieure d'un bourgeon de membre de poulet induit l'expression ectopique de *CDC25B*. La phosphatase *CDC25B* est donc régulée par la signalisation Shh non seulement dans le tube neural mais aussi dans le

bourgeon de membre. Afin de savoir si l'expression de *CDC25B* dépendante de Shh était la conséquence de l'action de la voie de signalisation sur la prolifération cellulaire nous avons bloqué le cycle cellulaire et analysé l'expression de *CDC25B*. Ces expériences suggèrent que la régulation de *CDC25B* qui est dépendante de Shh dans le tube neural n'est pas la conséquence de l'action de cette voie de signalisation sur la prolifération.

Ces données sont les premières à montrer un lien entre Shh et cet acteur du cycle cellulaire. La signalisation Shh régule donc positivement l'expression de deux régulateurs du cycle cellulaire agissant à deux périodes distinctes du cycle: la *Cycline D1* favorisant la progression en phase G1 et *CDC25B* contrôlant la transition G2/M. Ces résultats suggèrent donc que la régulation de la transition G2/M fait partie intégrante du contrôle de la prolifération dépendante de Shh.

B/ ARTICLE.

Linking the G2/M control with signalling pathways: the phosphatase CDC25B is regulated by Shh during embryonic development.

Identification of an unexpected link between the Shh pathway and a G2/M regulator, the phosphatase CDC25B

Bertrand BENAZERAF¹, Qiusheng CHEN^{1,2}, Emilie PECO¹, Valérie LOBJOIS¹, François MEDEVIELLE¹, Bernard DUCOMMUN² and Fabienne PITUELLO^{1,*}

¹ Centre de Biologie du Développement
UMR5547 CNRS-Université P. Sabatier
IFR109 – "Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes"
118 route de Narbonne
31062 Toulouse Cedex
France

² Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération
UMR5088 CNRS-Université P. Sabatier
IFR109 – "Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes"
118 route de Narbonne
31062 Toulouse Cedex
France

* Corresponding author : *E-mail address* : pituello@cict.fr, Fax : (33) 5 61 55 65 07,
Phone : (33) 5 61 55 67 39

Summary

Sonic hedgehog (Shh) signalling controls numerous aspects of Vertebrate development, including proliferation of precursors in different organs. Identification of molecules that link the Shh pathway to cell cycle machinery is therefore of major importance for an understanding of the mechanisms underlying Shh-dependent proliferation. Here, we show that an actor in the control of entry into mitosis, the phosphatase *CDC25B*, is a transcriptional target of Shh. Unlike other G2/M regulators, *CDC25B* is highly expressed in domains of Shh activity, including the ventral neural tube and the posterior limb bud. Loss- and gain-of-function experiments reveal that Shh is necessary and sufficient for *CDC25B* transcriptional activation in the neural tube. Moreover, *CDC25B* transcripts are absent from the posterior limb bud of *Shh*^{-/-} mice, while anterior grafts of Shh-expressing cells in the chicken limb bud induce ectopic *CDC25B* expression. Arresting the cell cycle does not reduce the level of *CDC25B* expression in the neural tube strongly suggesting that the upregulation of *CDC25B* is not an indirect consequence of the Shh-dependent proliferation. These data reveal an unexpected developmental link between the Shh pathway and a participant in G2/M control.

Introduction

The hedgehog (hh) signalling pathway controls several aspects of vertebrate life, intervening in phenomena as varied as patterning and growth of embryonic structures, renewal of stem cells and certain processes of regeneration and tissue repair (Beachy et al., 2004). During embryonic development, Sonic hedgehog (Shh) plays a key role in the establishment of bilateral asymmetry, in ventral patterning of the central nervous system and in morphogenesis of the limb (reviewed in (McMahon et al., 2003)). In the chick embryo, Shh is expressed asymmetrically during and after gastrulation at the left of Hensen's node, and is part of the cascade that determines bilateral asymmetry, ensuring the invariant left-right position of organs in the adult body (Levin et al., 1995). During spinal cord elongation, Shh activity, absent from the caudal neuroepithelium, where it is inhibited by FGF signalling, appears as a ventro-dorsally decreasing gradient in the closing neural tube (del Corral et al., 2003; Novitsch et al., 2003). It is subsequently a key actor in the specification of ventral neuronal subtypes in the spinal cord, where it operates as a morphogen, i.e., a graded signal that triggers distinct threshold responses, thereby specifying a series of different fates (reviewed in (Marquardt and

Pffaff, 2001; Wilson and Maden, 2005)). Shh is also the signal produced by the zone of polarizing activity (ZPA), that is responsible for normal anteroposterior patterning of the limb and the control of digit identities (Zeller, 2004). In this case, identities are specified not only by the level of exposure to Shh but also by differences in time of exposure (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004).

Besides mediating morphogenic responses, the hh signalling pathway has been shown to govern the size of different structures in the embryo by acting on cell growth (Duman-Scheel et al., 2002; Gritli-Linde et al., 2002), cell survival and/or cell proliferation (Ahlgren and Bronner-Fraser, 1999; Charrier et al., 2001; Jeong et al., 2004; Machold et al., 2003; Thibert et al., 2003), the latter being particularly well documented for the central nervous system (reviewed in (Ruiz i Altaba et al., 2002)). During embryonic development, Shh acts as a mitogen in the primordia of ventral and dorsal regions of the diencephalon and midbrain in early somite-stage mouse embryos (Britto et al., 2002; Ishibashi and McMahon, 2002). The spinal cord of mouse embryos misexpressing Shh displays overgrowth due to an overproliferation (Rowitch et al., 1999). Mice lacking negative feedback of hh signalling have a larger neural tube, possibly due to small increase in proliferation or survival rates that have cumulative effects over time (Jeong and McMahon, 2005). During mid-embryogenesis, the dorsal aspect of the brain, including the neocortex and cerebellum, undergoes rapid extension and Shh has been shown to promote proliferation of cerebellar granule cells and neocortical precursors ((Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Dahmane et al., 2001; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999) reviewed by (Ruiz i Altaba et al., 2002)). In the adult brain, neurogenesis occurs in the subventricular zone of the lateral ventricular walls of the forebrain and in the subgranular layer of the dentate gyrus of the hippocampus and Shh is required for neural progenitor proliferation in both areas (Lai et al., 2003; Machold et al., 2003; Palma et al., 2005; Palma and Ruiz i Altaba, 2004). Thus, accumulated evidence reveals that Shh is extensively involved in the control of cell proliferation. As a corollary, deregulation of this pathway have been associated with the initiation and growth of several cancers (Ruiz i Altaba et al., 2004).

The normal function of Shh signalling in the control of cell proliferation and its pathological role in the growth of malignant tumors make obvious the need to identify the effectors driving Shh-dependent proliferation. Mitogens enable cell cycle progression by permitting a bypass of the restriction point that divides the cell cycle into a growth factor-dependent phase (early G1) and a growth factor-independent phase (from late G1 through mitosis) (Ho and Dowdy, 2002). The target of mitogens are D-type cyclins, which assemble with cyclin-dependent

kinases CDK4/6 and promote G1-S transition. The proposed role of D-type cyclins in coupling extracellular signals to the cell cycle machinery make them ideal candidates to mediate Shh-dependent proliferation. Indeed, in *Drosophila*, hh signalling promotes transcription of cyclin D, thus regulating both cell growth (defined here as increase in mass) and proliferation (Duman-Scheel et al., 2002). In vertebrates, there are three D-type cyclins (D1, D2 and D3) and cyclin D1 and D2 are transcriptional targets mediating the mitogenic response to Shh of cerebellar granule cell precursors (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Kenney et al., 2003; Kenney and Rowitch, 2000; Oliver et al., 2003; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Loss of Shh function impedes the growth of both ventral and dorsal regions of diencephalon and midbrain, a growth defect associated with down-regulation of cyclin D1 expression (Britto et al., 2002; Ishibashi and McMahon, 2002). The initiation of cyclin D1 expression in the spinal cord primordium depends specifically on Shh and its maintenance in the neural tube favours proliferation at the expense of neuronal differentiation (Lobjois et al., 2004). All together, these data show that, like other mitogens, Shh acts on cyclin Ds to favour G1 progression during the cell cycle. In *Drosophila*, hh signalling has also been shown to promote proliferation by directly upregulating cyclin E expression, thus inducing DNA replication (Duman-Scheel et al., 2002), but there is as yet no evidence of such a connection in Vertebrates. In Vertebrate spinal cord, differentiation of ventralized progenitors into motor neurons seems to depend on two distinct periods of Shh signalling, including one late in the S phase but the molecular target is unknown (Ericson et al., 1996).

A link has also been observed between the Shh pathway and the G2/M transition in cell lines (Barnes et al., 2001). Entry into mitosis requires the activation of the M-phase promoting factor (MPF). The MPF consists of two proteins: the kinase CDK1 and the cyclin B1 (Doree and Hunt, 2002). At late G2, cyclin B-CDK1 translocates to the nucleus where it phosphorylates many nuclear substrates required for mitotic progression. In cell lines, the receptor of Shh, Patched 1, has been shown to interact with phosphorylated cyclin B1, thus maintaining it in the cytoplasm, while addition of Shh disrupts this interaction and allows cyclin B1 to localize to the nucleus (Barnes et al., 2001). However, the biological significance of such an interaction *in vivo* remains to be elucidated.

Activation of the cyclin B-CDK1 kinase is a key event required for the initiation of mitosis. This enzyme is normally maintained in an inactive state by phosphorylation of Thr14 and Tyr 15 by the Wee1 and Myt1 kinases. It is activated at the entry into mitosis by the CDC25 phosphatases, which dephosphorylate these residues (Kristjansdottir and Rudolph, 2004). In

Vertebrates, three phosphatases (A, B, and C) of the CDC25 family have been identified, two of which, CDC25B and CDC25C are regulators of G2/M transition while CDC25A has a more general role, being involved in both G1/S and G2/M cell-cycle transitions (Donzelli and Draetta, 2003). If CDC25B and CDC25C act in G2/M, their role does not seem to be identical, since the activity of CDC25B peaks before that of CDC25C and its overexpression induces premature mitosis more efficiently than the overexpression of CDC25C. It has thus been proposed that CDC25B acts in late G2 to induce very early mitotic events (Dutertre et al., 2004; Karlsson et al., 1999). CDC25B is also required for efficient mitotic entry after a DNA-activated G2 checkpoint arrest (van Vugt et al., 2004). In chicken sequence databases we found only two of these phosphatases, CDC25A and B. Here, we accumulate evidence showing that CDC25B is linked to Shh signalling in early embryonic patterning events. Thus, CDC25B is expressed asymmetrically at the level of Hensen's node, in a ventro-dorsally decreasing gradient in the closing neural tube and a postero-anteriorly decreasing gradient in the developing limb bud. Furthermore, we demonstrate, by loss- and gain-of function experiments, that Shh signalling activates *CDC25B* in the neural tube of chicken embryo and in the limb bud of both chick and mouse embryos. Arresting the cell cycle does not affect the ventro-dorsal gradient of *CDC25B* expression in the neural tube suggesting that Shh is able to upregulate *CDC25B* independently of its effect on proliferation. All together, these data establish a novel link between the Hh pathway and the cell cycle machinery and suggest that the Hh pathway may control the G2/M transition; at least part of this control may proceed through transcriptional regulation of *CDC25B*.

Materials and methods

Embryos

Fertile hens' eggs were incubated at 38°C in a humidified incubator to yield embryos of appropriate stages (Hamburger and Hamilton, 1992). Mouse embryos were collected at various stages, considering the morning when vaginal plug was detected as day 0.5 p.c. Shh-deficient embryos were a gift from R. Zeller.

Modulation of the Shh signalling pathway

Cyclopamine administration and electroporation of *Shh* cDNA were performed as described elsewhere (Lobjois et al., 2004). Pellet implantations in the limb bud were performed as described in (Riddle et al., 1993) using cells prepared as described in (Poncet et al., 1996).

Drug administration for cell cycle arrest

Cell cycle arrest was achieved by incubating embryos in petri dishes in Tyrode's solution supplemented with Aphidicolin (5 to 16µM), mimosin (400µM) or hydroxyurea (1 to 2mM) for 3 or 4 hr at 38°C. Control embryos were treated with DMSO alone under the same conditions.

In situ hybridisation

In situ hybridisation was performed as previously described (Lobjois et al., 2004). *CDC25B* expression patterns were analysed in chicken embryos using the antisense digoxigenin-RNA probe prepared from the ChEST20315 (obtained from the HGMP-RC) coding for part of the *CDC25B* cDNA. *Cyclin B2* was a gift of E. Nigg (Gallant and Nigg, 1992). Fragments of chicken *CDC25A* and *CDK1* coding regions were obtained by PCR. The primers used were: 5'-CTGCAGCAGAAATTGAGAGC-3' and 5'-CAATTAACCCTCACTAAAGGGATGTGGTGTGATGTGC-3' for *CDC25A*; 5'-CCACAGCCATGGAGGATTAC-3' and

5'-CACATCAGGCCACACATCAT-3' for *CDK1*.

In gain-of-function experiments, probes were synthesised from isolated specific PCR fragments to avoid any cross-reactivity with the transgenes. *CDC25A* was obtained by means of the primers described above; *CDC25B* with 5'-GGAGCCCTGCGTGCCGAG-3' and 5'-CAATTAACCCTCACTAAAGGGTCCTGGTGTTTGCC-3'. *GFP* and *Shh* transgenes were detected using fluorescein-RNA probes synthesized as described previously (Lobjois et al., 2004). A fragment of mouse *CDC25B* coding regions was obtained by PCR. The primers used were: 5'-ACTCCTGTCGAAAGGGCTTC-3' and 5'-GCAGAAAGGTCTCAGCATCC -3'. Vibratome sectioning was performed as previously described (Lobjois et al., 2004).

Cell proliferation analysis

Cell proliferation was evaluated by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (BrdU labelling and detection kit I, Roche). BrdU (10mM) was injected into the lumen of the neural tube and the embryos were harvested 30 minutes later. Cells expressing the phospho-Histone H3 (P-H3) were visualized by performing immunocytochemistry with the polyclonal anti-P-H3 antibody (Upstate biotechnology, dilution 1/1000). BrdU and P-H3 immunodetections were performed on 12µm frozen sections as previously described (Lobjois et al., 2004). Immunodetection of P-H3 after *in situ* hybridisation was performed by using the Vectastain kit (Vector laboratories).

Flow cytometry analysis

A piece of neural tube was cut from control or treated embryos corresponding to the prospective -V to +V somite level in the presence of 1X pancreatin (Gibco). The explants were stored in ice-cold PBS plus 2% BSA for less than one hour and samples of 3 explants each centrifuge at 1000g for 5 minutes. The supernatant was then discarded and the sample stored at -80°C prior flow cytometry analysis. The preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis was performed according to Vindelov and coll. (Vindelov et al., 1983). Stained cells were scanned in a Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer, and the cell cycle profile was quantified using Cellquest and ModFit software.

Results

CDC25B transcriptional activation correlates with domains of Shh activity

We used the chick embryo as a model to define the expression domains of *CDC25B* by in situ hybridisation during embryonic development. We observed an asymmetric expression of *CDC25B* on the left of Hensen's node from stage 5HH (Hamburger and Hamilton, 1992) onwards (Fig. 1a,c and data not shown) correlating with the asymmetric expression of Shh reported during and after gastrulation (Levin et al., 1995). In stage 10HH embryos, the transcripts are absent from the most caudal aspect of the neuroepithelium (Fig. 1d, e, h) where Shh activity could be inhibited by FGF signalling (del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003). However, they are present on both sides of the floor plate (Fig. 1b,g) and display a ventro-dorsally decreasing gradient in the closing neural tube (Fig. 1b,f), as previously observed for Shh target genes such as *Gli1* (Lobjois et al., 2004). In 3-day-old embryos (stage 18HH), *CDC25B* is still expressed in a discrete ventral domain in the neural tube (Fig. 1i). In later stage embryos (stage 22-23 HH), *CDC25B* is broadly expressed in the developing spinal cord, including the dorsal region, and appears in the dorsal root ganglia (Fig. 1k), suggesting that, from that stage, *CDC25B* transcription is not exclusively associated with regions of Shh activity and may also be regulated in a cell cycle-dependent fashion (Kakizuka et al., 1992). In the limb bud of 3-day-old embryos, *CDC25B* is expressed in a decreasing postero-anterior gradient in the mesenchymal cells (Fig. 1j). All together, these data establish that, during early embryonic development, domains of Shh activity coincide with high levels of *CDC25B* transcripts, suggesting that Shh may regulate *CDC25B* expression.

Other actors controlling the G2/M transition are not restricted to zones of Shh activity

To determine whether other cell cycle regulators acting at the G2-M transition are preferentially expressed in zones of Shh activity, we first investigated whether cyclin B and CDK1 transcripts were also upregulated in Shh-responding domains. In two-day-old chicken embryos, both cyclin B (data not shown) and CDK1 (Fig. 2a-d) are ubiquitously expressed. In both cases, we also observed scattered cells displaying a higher level of transcripts, for instance, in the neuroepithelium (Fig. 2b-c, arrows), but these had no obvious relationship to

Shh-responding domains, since they could be observed dorsally as well as ventrally. In two-day chicken embryos, the widespread expression of CDK1 in the neural tube correlates well with the fact that at this stage most of the cells are proliferating, as visualized by BrdU incorporation (Fig. 2e-g). This confirms that transcription of CDK1 or cyclin B cannot be correlated with domains of Shh activity.

The coincidence we observed between Shh-responding domains and *CDC25B* transcription prompted us to examine the expression pattern of *CDC25A*, the second CDC25 phosphatase that was identified in the chicken genome. Interestingly, *CDC25A* also displays discrete domains of expression, in some respects complementary to those of *CDC25B*. For example, in two-day-old embryos, the transcripts are detected in the posterior part of the neuroepithelium (Fig. 2h-l compare with 1d-h); then they gradually diminish in the ventral part of the closing neural tube and resolve to a clear dorso-ventrally decreasing gradient in the closed neural tube (Fig. 2j,k). One day later, the transcripts are predominantly expressed in the dorsal part of the neural tube (Fig. 2o). In the limb bud, *CDC25A* is broadly expressed in the mesenchyme along the proximo-distal axis and in scattered cells in the ectoderm (Fig. 2m,n). Taken together, these data show that transcripts encoding regulators of the G2-M transition, such as *CDK1* and *cyclin B*, are widely expressed in the developing embryo, while those encoding the *CDC25s* phosphatase display specific domains of expression, suggesting that at least part of their regulation is linked to specific signalling pathways.

Shh activity controls CDC25B expression in the neural tube

To demonstrate unambiguously that transcription of the phosphatase *CDC25B* responds to Shh signalling, we chose the chicken neural tube as a model system. We first examined the effect of an activation of the Shh pathway on *CDC25B* expression, by transfecting a Shh-expression construct in the caudal neural plate of HH stage-10 chicken embryos using *in ovo* electroporation. As shown in figure 3 (a-c), 6-7 hr after *Shh* transfection, *CDC25B* was clearly induced ectopically on the electroporated side (n=24/30). Despite the fact that only a few cells misexpressed Shh, increased levels of *CDC25B* transcripts could be seen throughout the lateral wall of the neuroepithelium, clearly indicating to a non-cell autonomous effect, as would be expected from a regulation by a diffusible molecule. This upregulation of *CDC25B* was observed within 6 hr; considering that the transgene (GFP) is first detected only 2-3 hr after electroporation, this means that upregulation of *CDC25B* occurs in less than 6hr.

CDC25B expression was unchanged in embryos transfected with an empty vector (n=0/28; data not shown).

We then tested whether Shh could also affect *CDC25A* expression. In response to a robust forced expression of Shh, the amount of *CDC25A* transcripts was, at best, only slightly increased (Fig. 3d-f) (7/12 experimental embryos displayed a minor upregulation, as shown in Fig. 3f, whereas 5/12 experimental and 8/8 control embryos were unaffected). Together, these data show that Shh activity is sufficient to induce a high level of *CDC25B* expression in the neural tube, whereas its effect on *CDC25A* is insignificant.

We then sought to determine whether the expression of *CDC25B* in the neuroepithelium is Shh-dependent. We blocked the Shh signalling pathway by cyclopamine treatment (Incardona et al., 1998). Cyclopamine complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HBC) as a carrier or HBC alone was injected in the neural tube and neural groove of stage-9-10 chicken embryos and the effect was analysed 3 to 6 hr later. Cyclopamine injection resulted in a dramatic reduction of the expression of *CDC25B* in a dose-dependent manner (Fig. 3g). As in the gain-of-function experiments, the effect was very rapid, since the downregulation of *CDC25B* was already apparent after 3 hr (n=10/10 and n=0/8 respectively for treated and control embryos). We therefore conclude that Shh signalling is necessary for transcriptional activation of *CDC25B* in the neural tube. The expression of *CDK1* (data not shown, n=0/5) or *CDC25A* (Fig.3h) was not significantly affected by cyclopamine treatment, confirming that Shh signalling specifically regulates the transcription of *CDC25B*.

***CDC25B* transcription is regulated by Shh activity in the limb bud of chick and mouse embryos**

Because of the importance of Shh in the control of cell proliferation in normal and cancer tissues, we wished to know whether the link we have established between the hh pathway and the cell cycle machinery in chicken is conserved in mammals. A previous analysis of *CDC25B* (referred to there as *CDC25M2*) transcripts during mouse development reported that the gene was expressed in a developmentally-regulated and cell-cycle-dependent fashion (Kakizuka et al., 1992). We therefore asked whether the *CDC25B* transcript is upregulated in domains of Shh activity. Analysis of the *CDC25B* expression pattern in 8.5-9dpc mouse embryos (corresponding to stage 10-14 in chicken) confirmed that *CDC25B* transcripts are present in the developing spinal cord (Fig. 4a-d). As we showed in the chicken embryo, *CDC25B* is absent from the caudal neuroepithelium and present in the closing neural tube, we

were unable to discern a ventro-dorsal gradient of expression like that seen in chicken embryos. We clearly saw scattered cells expressing a higher level of transcripts in the *CDC25B* expression domain (arrows in Fig. 4b). In 10.5dpc mouse embryos, however, whereas *CDC25B* is still widely expressed in the alar plate of the spinal cord, a discrete domain of expression can be seen flanking the floor plate, i.e., the source of Shh, in the basal plate. We then turned to the limb bud and found that, as in the chick, *CDC25B* transcripts are preferentially expressed in the posterior aspect of the limb bud (Fig. 4e-f). These data suggest that the transcriptional regulation of *CDC25B* may be partly controlled by Shh activity in mammals as well.

To confirm that *CDC25B* expression in the limb bud depends upon Shh activity, we analysed the expression pattern in Shh mutant mice. *CDC25B* transcripts are vitually absent from the limb bud of Shh^{-/-} mice (Fig. 5c-d; n=4/4), since they are only detected in scattered cells reminiscent of migrating myogenic precursors (Fig. 5a-d, arrowheads)(Buckingham et al., 2003). *CDC25B* transcripts are clearly detectable in the dorsalisated neural tube of these mutants (Fig 5c-d and data not shown) (Chiang et al., 1996), in correlation with their expression in the alar plate of wild-type embryos. These results support the conclusion that Shh activity regulates the expression of *CDC25B* in developing mouse limb buds. To ascertain whether *CDC25B* responds to Shh signalling in the limb bud, we implanted pellets of Shh-expressing cells (Pourquie et al., 1996) into the anterior margin of 3.5-day-old chicken embryos (Fig. 5e-f). Exposure of limb bud cells to Shh-expressing cells for 6-7 hr induced ectopic upregulation of *CDC25B* (n=9/9 and n=0/6 respectively for Shh-QT6 and control-QT6 grafted embryos) (Fig. 5e-f). Thus, we conclude that Shh contributes to the upregulation of *CDC25B* expression in the limb bud of vertebrate embryos.

Arresting the cell cycle does not reduce CDC25B expression while inhibition of the Shh pathway affects CDC25B expression without cell cycle arrest

CDC25B can be transcriptionally regulated in a cell-cycle dependent fashion, transcripts accumulating in S phase and remaining elevated until the G2-M transition to disappear in G1 (Kakizuka et al., 1992). Shh being well known to favour proliferation, we could not exclude that the upregulation of *CDC25B* in domains of Shh activity was an indirect consequence of the Shh-dependent proliferation. To determine whether it was the case, we blocked the cell cycle progression by aphidicolin treatment and looked at *CDC25B* expression. Aphidicolin impedes DNA replication (Pedrali-Noy et al., 1980) and, as expected, neural tubes of treated

embryos stopped to incorporate BrdU already after 3 hr of treatment (Fig. 6a,b). The cell-cycle arrest was validated by the virtual absence of mitotic cells in aphidicolin-treated embryos (Fig. 6b, data not shown). In these experimental conditions, *CDC25B* transcript level was not reduced and moreover the ventro-dorsal gradient of expression was still apparent in the ventral neural tube. To our surprise, the staining seemed even stronger in treated versus control embryos (compare Fig. 6c and f; n=4/5 embryos). This observation prompted us to verify if aphidicolin-treated neural tubes contained cells arrested in G2 phase since the cell-cycle-dependent expression of *CDC25B* peaks in G2 and aphidicolin has been shown to affect the G2 to M transition in some conditions (Fukuda and Ohashi, 1983; Tanaka et al., 1998). A flow cytometry analysis performed on neural tubes explanted from aphidicolin-treated embryos revealed that a substantial number of cells in G2 were still present (Fig. 6i; n=6 samples of 3 neural tubes each). Similar results were obtained with higher doses of aphidicolin (up to 16 μ M), longer treatment (up to 4 hr then cell cycle arrest becomes toxic for the embryo), the use of other cell cycle inhibitors (including hydroxyurea and mimosin) (data not shown). Therefore, we cannot ascertain that the ventral expression of *CDC25B* is entirely cell-cycle-independent since it may be due to the remaining G2 cells.

If the ventral expression of *CDC25B* was exclusively cell cycle dependent, and mainly due to cells in G2 phase, cyclophamide-treated neural tubes in which *CDC25B* expression is drastically diminished should display a strong cell cycle arrest phenotype with a clear reduction of the percentage of cells in G2. To examine this hypothesis we dissected neural tube regions of cyclophamide treated embryos and performed cell cycle analysis using flow cytometry (Fig. 6p). We observed that, DNA profiles from cyclophamide-treated embryos (n=9 samples of 3 neural tubes each) were not severely altered compared to those obtained for HBC-treated embryos (n=9 samples of 3 neural tubes each) and mitotic cells were still present in cyclophamide-treated embryos (Fig. 6m-o). The percentage of cells in G1 is significantly lower in control embryos (47.7 \pm 1.4% SEM) than in cyclophamide-treated embryos (50.8 \pm 0.6% SEM), while the percentage of cells progressing through S phase dropped from 33% (\pm 1.3% SEM) for control embryos to 28.8% (\pm 0.6% SEM) for cyclophamide-treated embryos. However, the percentage of cells in G2+M is not significantly different in control (19.2 \pm 0.8% SEM) versus cyclophamide-treated embryos (20.3 \pm 0.8% SEM) (Fig. 6p). Thus, we can conclude that the loss of *CDC25B* expression that we observed in the cyclophamide experiments is not related to major changes in cell cycle distribution.

The fact that we see a clear reduction of *CDC25B* transcript level in cyclophamide-treated embryos, without reduction of the G2+M population, and that the gradient of *CDC25B* is still

observable in the ventral neural tube of chicken treated with aphidicolin strongly suggest that Shh is able to upregulate *CDC25B* independently of its effect on proliferation.

Discussion

The CDC25 phosphatases are transcriptionally regulated by signalling pathways during development

The CDC25 phosphatases are well known to be transcriptionally regulated in a cell-cycle dependent fashion (Jinno et al., 1994; Kakizuka et al., 1992; Nagata et al., 1991; Sadhu et al., 1990). The expression of *CDC25B* is up regulated during cell cycle progression, transcripts accumulating in S phase and remaining elevated until the G2-M transition, finally disappearing in G1 (Kakizuka et al., 1992). The present study establishes that modification of Shh activity leads to rapid changes of *CDC25B* level of expression in the embryo suggesting that part of its transcriptional regulation is linked to that signalling pathway. We accumulate data suggestive of a direct effect of Shh on *CDC25B* rather than an indirect consequence of the Shh-dependent action on proliferation. The fact that expression of other G2/M regulators such as *CDK1*, *cyclin B* and *CDC25A* are not affected in the Shh gain- and loss-of-function experiments argues against the latter possibility. Furthermore in these experiments, modulation of *CDC25B* expression is very rapid (respectively less than 6hr and 3hr). The length of the cell cycle in the neural tube has been estimated at between 6.3 and 8 hr (Langman et al., 1966; Smith and Schoenwolf, 1987). The regulation of *CDC25B* thus occurs in less time than the length of the cell cycle, making it highly unlikely that the effect of Shh on *CDC25B* is an indirect consequence of an overall modification of proliferation. Finally, blocking the cell cycle did not reduce the level of *CDC25B* transcripts while cyclophamide treatment down regulates *CDC25B* expression without drastic modification of the cell cycle suggesting once again that Shh regulates *CDC25B* expression independently of its effect on proliferation.

In the cell cycle blocking experiments, we observe a double block at the G1 to S and G2 to M transitions even when we used high doses of aphidicolin known to arrest cells preferentially at G1/S phase, either because the population of neural progenitors is asynchronous or because it displays a specific response to cell cycle arrest. We noticed an upregulation of *CDC25B* which can reflect an abnormal accumulation of transcripts in that population of cells arrested in G2 phase. Indeed, we also observed an expression of *CDC25B*

that is suggestive of a cell-cycle-dependent regulation in the spinal cord. In early stages, we sometimes observed few scattered cells faintly stained outside the ventral domain of expression (see arrow on figure 6d). In later stages, *CDC25B* is strongly expressed in both the ventral and dorsal aspects of the spinal cord and is restricted along the apico-basal axis, being stronger basally at the border of the ventricular zone and present in some cells along the lumen. In the ventricular zone, nuclei and surrounding cytoplasm undergo radial movements as a function of the cell cycle, chromosome replication occurring basally and mitosis at the apical surface, the G1 and G2 cells being located at intermediate positions. Therefore, the spatial distribution of the transcripts in the ventricular zone at later stages of spinal cord development is suggestive of a cell cycle-dependent regulation, while the uniform expression observed in the ventral aspect of the neural tube evokes a Shh-dependent regulation.

Interestingly, we have also observed that *CDC25A* expression is regionalised during early development, while the expression of other G2/M regulators is not. Furthermore in the spinal cord primordium *CDC25A* seems roughly complementary to *CDC25B*, being present in the caudal neural groove while *CDC25B* appears in the closing neural tube and displaying a dorso-ventrally decreasing gradient whereas *CDC25B* shows an opposite one. Consequently, *CDC25A* is probably linked to a specific signalling pathway which remains to be identified. It is thus interesting to note that the decreasing dorso-ventral gradient of *CDC25A* transcripts in the neural tube correlates with the dorso-ventral gradient of cell proliferation controlled by the Wnt signalling pathway (Megason and McMahon, 2002). In the light of all these results, we propose that the CDC25 phosphatases are specifically regulated by signalling pathways that govern developmental process, thus establishing an unexpected link between these pathways and regulators of the cell cycle machinery acting at the G2-M transition.

Shh controls expression of regulators acting at the G1/S and G2/M transitions.

Numerous examples, including during CNS development (cf. introduction), reports that the positive regulators of G1 progression, *cyclin D1* and *D2*, are transcriptional targets mediating the mitogenic response of Shh (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Kenney et al., 2003; Kenney and Rowitch, 2000; Oliver et al., 2003; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). We also showed that, in the developing spinal cord, Shh specifically activates *cyclin D1* expression (Lobjois et al., 2004) and accordingly, we observe that blocking the Shh pathway hinders the G1 to S transition (this study). Here we show that Shh also controls the

expression of one of the regulators of the G2/M transition, the phosphatase *CDC25B*. The Shh mitogenic signal could thus influence cell cycle progression by controlling expression of different cell cycle regulators: *cyclins D* acting in G1 progression and *CDC25B* phosphatase acting at the G2/M transition.

The hypothesis that Shh exerts a control at the G2-M transition is supported by recent data showing a link between the Shh signalling pathway and another actor of the G2/M transition, cyclin B1 (Barnes et al., 2001). In cell lines, the receptor of Shh, Patched1, is able to interact with cyclin B1 thus maintaining it in the cytoplasm. Addition of Shh disrupts this interaction and allows cyclin B1 to enter the nucleus, possibly allowing the formation of the cyclin B1-CDK1 (MPF) complex. Furthermore, the same group recently showed that Shh signalling activity is regulated during the cell cycle, being more active in the prophase of mitosis (Barnes et al., 2005). Therefore, we propose that Shh positively regulates G2/M progression in two complementary ways: first, by the release of cyclin B1 from Ptc, allowing the nuclear localisation of MPF, second by up-regulation of *CDC25B* expression, thereby activating the MPF complex required for the entry into mitosis.

The functional relevance of the link between the Shh pathway and the G2/M transition remains to be elucidated. *CDC25B* displays discrete domains of expression during mouse development ((Kakizuka et al., 1992) and this study) and we show that it is regulated by Shh at least in the limb bud. On the other hand, *CDC25B*^{-/-} mice are viable and healthy, although females are sterile due to a meiotic defect during oogenesis (Lincoln et al., 2002). *CDC25A* and *CDC25C* are also expressed in the mouse limb bud (B.B. unpublished observation) and therefore may functionally compensate for *CDC25B* but it should be noticed that mice lacking both *CDC25B* and *CDC25C* do not display developmental or mitotic defects (Ferguson et al., 2005). The fact that we found only two phosphatases *CDC25s* (A and B) in the chicken genome and that they display complementary patterns in the developing neural tube set up a putative suitable model system to elucidate their developmental function. In the neural tube, the upregulation of *CDC25B* via Shh may be correlated to two events: an increase in the mitotic density in the ventral neural tube (Corliss and Robertson, 1963); the onset of neuronal differentiation occurring soon after (Diez del Corral et al., 2002). The limited effect of cyclopamine on cell cycle we report here suggests that Shh may just boost up proliferation of neural progenitor cells. It is interesting to notice that in addition to its classical role in mitosis CDK1/cyclin B activity has also been implicated in cell cycle exit and in asymmetric cell division. In the cerebellar granule neuron precursors, CDK1 complexes play a prime role in regulating N-myc phosphorylation-mediated degradation thus favouring cell cycle exit

(Kenney et al., 2004) (Sjostrom et al., 2005). In *Drosophila*, asymmetric divisions of neural progenitors require high levels of CDK1/cyclin B activity to maintain the asymmetric localization of the apical components during mitosis (Tio et al., 2001). Vertebrate neural progenitor cell divisions exhibit some characteristic features of asymmetric invertebrate cell divisions suggesting that segregating determinants are involved here as well in the making of neurones (Betschinger and Knoblich, 2004). It is then tempting to speculate that the upregulation of *CDC25B* by Shh in the neural tube may boost up mitosis in the ventral neural tube and/or favour cell cycle exit or asymmetric cell division to promote the onset of neuronal differentiation. It should be kept in mind that, beside its transcriptional regulation, *CDC25B* is well known to be submitted to post-translational regulation which will influence its stability and sub-cellular localization ((Dutertre et al., 2004);(Mirey et al., 2005)) and therefore may also contribute to its timing of activation.

In conclusion, we have identified a cell cycle regulator, *CDC25B*, as a new target of Shh signalling during embryonic development, both in chick and mice. Shh controls expression of regulators acting at two key steps of the cell cycle: progression through G1 (Lobjois et al., 2004; Ruiz i Altaba et al., 2002) and the G2/M transition (this study). While the control of G1 progression may maintain discrete pools of cycling progenitors (Lobjois et al., 2004), the significance of the control of the G2/M transition remains to be clarified. It nevertheless seems clear that, by virtue of its ability to regulate the cell cycle, Shh can coordinate proliferation with the patterning programme at numerous steps of Vertebrate development. Since several types of cancer have been linked to disruption of the hh pathway, identification of molecules that link that pathway to cell cycle machinery is of major importance, not only for an understanding of the mechanisms underlying hh-dependent proliferation, but also because they may represent putative therapeutic targets for cancer therapy.

Acknowledgements

We are particularly grateful to Drs R. Zeller and S. Mella for the gift of Shh mutant embryos and Cathy Soula for her help in grafting pellets in the limb bud. We would like to thank Drs J. Lahti and C. Tabin for the gift of plasmids. We thank Drs S. Bel-Vialar, P. Cochard, J. Smith, C. Soula, A. Vincent for their comments on the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, le Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche, l'Association pour la Recherche sur le Cancer and la Ligue Nationale contre le Cancer "Equipe Labellisée 2005" (to BD).

References

- Ahlgren, S. C., and Bronner-Fraser, M. (1999). Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. *Curr Biol* **9**, 1304-14.
- Ahn, S., and Joyner, A. L. (2004). Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* **118**, 505-16.
- Barnes, E. A., Heidtman, K. J., and Donoghue, D. J. (2005). Constitutive activation of the shh-ptc1 pathway by a patched1 mutation identified in BCC. *Oncogene* **24**, 902-15.
- Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., and Donoghue, D. J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *Embo J* **20**, 2214-23.
- Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., and Berman, D. M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**, 324-31.
- Betschinger, J., and Knoblich, J. A. (2004). Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol* **14**, R674-85.
- Britto, J., Tannahill, D., and Keynes, R. (2002). A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain. *Nat Neurosci* **5**, 103-10.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* **202**, 59-68.
- Charrier, J. B., Lapointe, F., Le Douarin, N. M., and Teillet, M. A. (2001). Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development* **128**, 4011-20.

- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Corliss, C. E., and Robertson, G. G. (1963). The Pattern of Mitotic Density in the Early Chick Neural Epithelium. *J Exp Zool* **153**, 125-40.
- Dahmane, N., and Ruiz i Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* **126**, 3089-100.
- Dahmane, N., Sanchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H., and Ruiz i Altaba, A. (2001). The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* **128**, 5201-12.
- del Corral, R. D., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., and Storey, K. (2003). Opposing FGF and Retinoid Pathways Control Ventral Neural Pattern, Neuronal Differentiation, and Segmentation during Body Axis Extension. *Neuron* **40**, 65-79.
- Diez del Corral, R., Breitkreuz, D. N., and Storey, K. G. (2002). Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signalling. *Development* **129**, 1681-91.
- Donzelli, M., and Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4**, 671-7.
- Doree, M., and Hunt, T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* **115**, 2461-4.
- Duman-Scheel, M., Weng, L., Xin, S., and Du, W. (2002). Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* **417**, 299-304.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J. P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C., and Ducommun, B. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* **117**, 2523-31.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661-73.
- Ferguson, A. M., White, L. S., Donovan, P. J., and Piwnicka-Worms, H. (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol Cell Biol* **25**, 2853-60.

- Fukuda, M., and Ohashi, M. (1983). Aphidicolin inhibits cell growth by accumulation of G2 cells. *Cell Biol Int Rep* **7**, 579-85.
- Gallant, P., and Nigg, E. A. (1992). Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol* **117**, 213-24.
- Gritli-Linde, A., Bei, M., Maas, R., Zhang, X. M., Linde, A., and McMahon, A. P. (2002). Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* **129**, 5323-37.
- Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* **195**, 231-72.
- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P., and Tabin, C. J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517-28.
- Ho, A., and Dowdy, S. F. (2002). Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 47-52.
- Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P., and Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* **125**, 3553-62.
- Ishibashi, M., and McMahon, A. P. (2002). A sonic hedgehog-dependent signaling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo. *Development* **129**, 4807-19.
- Jeong, J., Mao, J., Tenzen, T., Kottmann, A. H., and McMahon, A. P. (2004). Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev* **18**, 937-51.
- Jeong, J., and McMahon, A. P. (2005). Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* **132**, 143-54.
- Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *Embo J* **13**, 1549-56.
- Kakizuka, A., Sebastian, B., Borgmeyer, U., Hermans-Borgmeyer, I., Bolado, J., Hunter, T., Hoekstra, M. F., and Evans, R. M. (1992). A mouse cdc25 homolog is differentially and developmentally expressed. *Genes Dev* **6**, 578-90.

- Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I., and Pines, J. (1999). Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *J Cell Biol* **146**, 573-84.
- Kenney, A. M., Cole, M. D., and Rowitch, D. H. (2003). Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* **130**, 15-28.
- Kenney, A. M., and Rowitch, D. H. (2000). Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol* **20**, 9055-67.
- Kenney, A. M., Widlund, H. R., and Rowitch, D. H. (2004). Hedgehog and PI-3 kinase signaling converge on Nmyc1 to promote cell cycle progression in cerebellar neuronal precursors. *Development* **131**, 217-28.
- Kristjansdottir, K., and Rudolph, J. (2004). Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol* **11**, 1043-51.
- Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H., and Schaffer, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* **6**, 21-7.
- Langman, J., Guerrant, R. L., and Freeman, B. G. (1966). Behavior of neuro-epithelial cells during closure of the neural tube. *J Comp Neurol* **127**, 399-411.
- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**, 803-14.
- Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P., Tessarollo, L., and Donovan, P. J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet* **30**, 446-9.
- Lobjois, V., Benazeraf, B., Bertrand, N., Medevielle, F., and Pituello, F. (2004). Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Dev Biol* **273**, 195-209.
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritli-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L., Dudek, H., McMahon, A. P., and Fishell, G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**, 937-50.
- Marquardt, T., and Pfaff, S. L. (2001). Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube. *Cell* **106**, 651-4.
- McMahon, A. P., Ingham, P. W., and Tabin, C. J. (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* **53**, 1-114.

- Megason, S. G., and McMahon, A. P. (2002). A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* **129**, 2087-98.
- Mirey, G., Chartrain, I., Froment, C., Quaranta, M., Bouche, J. P., Monsarrat, B., Tassan, J. P., and Ducommun, B. (2005). CDC25B phosphorylated by pEg3 localizes to the centrosome and the spindle poles at mitosis. *Cell Cycle* **4**, 806-11.
- Nagata, A., Igarashi, M., Jinno, S., Suto, K., and Okayama, H. (1991). An additional homolog of the fission yeast *cdc25+* gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells. *New Biol* **3**, 959-68.
- Novitch, 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.
- Oliver, T. G., Grasfeder, L. L., Carroll, A. L., Kaiser, C., Gillingham, C. L., Lin, S. M., Wickramasinghe, R., Scott, M. P., and Wechsler-Reya, R. J. (2003). Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7331-6.
- Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335-44.
- Palma, V., and Ruiz i Altaba, A. (2004). Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* **131**, 337-45.
- Pedrali-Noy, G., Spadari, S., Miller-Faures, A., Miller, A. O., Kruppa, J., and Koch, G. (1980). Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin. *Nucleic Acids Res* **8**, 377-87.
- Poncet, C., Soula, C., Trousse, F., Kan, P., Hirsinger, E., Pourquie, O., Duprat, A. M., and Cochard, P. (1996). Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech Dev* **60**, 13-32.
- Pourquie, O., Fan, C. M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Breant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M., and Le Douarin, N. M. (1996). Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell* **84**, 461-71.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-16.

- Rowitch, D. H., B. S. J., Lee, S. M., Flax, J. D., Snyder, E. Y., and McMahon, A. P. (1999). Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci* **19**, 8954-65.
- Ruiz i Altaba, A., Stecca, B., and Sanchez, P. (2004). Hedgehog-Gli signaling in brain tumors: stem cells and paradevelopmental programs in cancer. *Cancer Lett* **204**, 145-57.
- Ruiz i Altaba, A., Palma, V., and Dahmane, N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* **3**, 24-33.
- Sadhu, K., Reed, S. I., Richardson, H., and Russell, P. (1990). Human homolog of fission yeast *cdc25* mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5139-43.
- Sjostrom, S. K., Finn, G., Hahn, W. C., Rowitch, D. H., and Kenney, A. M. (2005). The cdk1 complex plays a prime role in regulating N-myc phosphorylation and turnover in neural precursors. *Dev Cell* **9**, 327-38.
- Smith, J. L., and Schoenwolf, G. C. (1987). Cell cycle and neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate. *Anat Rec* **218**, 196-206.
- Tanaka, H., Takenaka, H., Yamao, F., and Yagura, T. (1998). Aphidicolin induces alterations in Golgi complex and disorganization of microtubules of HeLa cells upon long-term administration. *J Cell Physiol* **176**, 602-11.
- Thibert, C., Teillet, M. A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N. M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* **301**, 843-6.
- Tio, M., Udolph, G., Yang, X., and Chia, W. (2001). *cdc2* links the Drosophila cell cycle and asymmetric division machineries. *Nature* **409**, 1063-7.
- van Vugt, M. A., Bras, A., and Medema, R. H. (2004). Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell* **15**, 799-811.
- Vindelov, L. L., Christensen, I. J., and Nissen, N. I. (1983). A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* **3**, 323-7.
- Wallace, V. A. (1999). Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* **9**, 445-8.
- Wechsler-Reya, R. J., and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* **22**, 103-14.
- Wilson, L., and Maden, M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* **282**, 1-13.

Zeller, R. (2004). It takes time to make a pinky: unexpected insights into how SHH patterns vertebrate digits. *Sci STKE* **2004**, pe53.

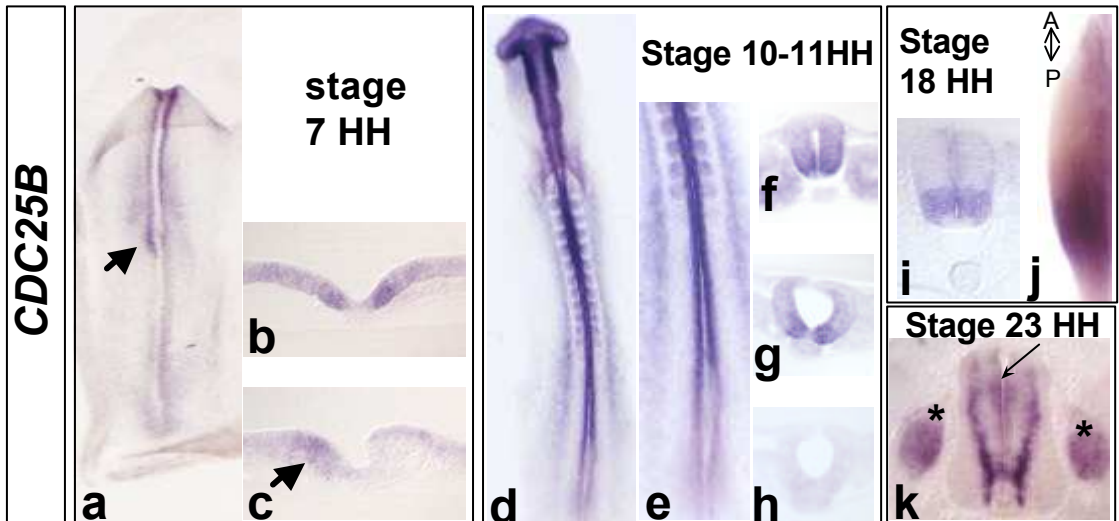


Figure 1: The spatio-temporal pattern of expression of *CDC25B* evokes a *Shh*-responding gene. a-k: *CDC25B* expression visualised by *in situ* hybridisation in chicken embryos. a, dorsal view of a stage-7 embryo; b, c: cross-sections of a; note the asymmetric expression at the level of Hensen's node (arrows in a and c). d, e: dorsal views of a stage-10-11 embryo; e, is a higher magnification of the caudal region in d; f, g, h: cross sections of d; note the ventro-dorsal gradient in the neural tube and the absence of staining in the floor plate (f, g). i, cross-section of stage-18 embryo showing the staining in the neural tube at the level of the wing bud. j, dorsal view of the wing bud of the same embryo; note the higher posterior expression of *CDC25B* (the double arrow marks the antero(A)-posterior(P) axis); Cross sections are oriented dorsal to the top in all panels.

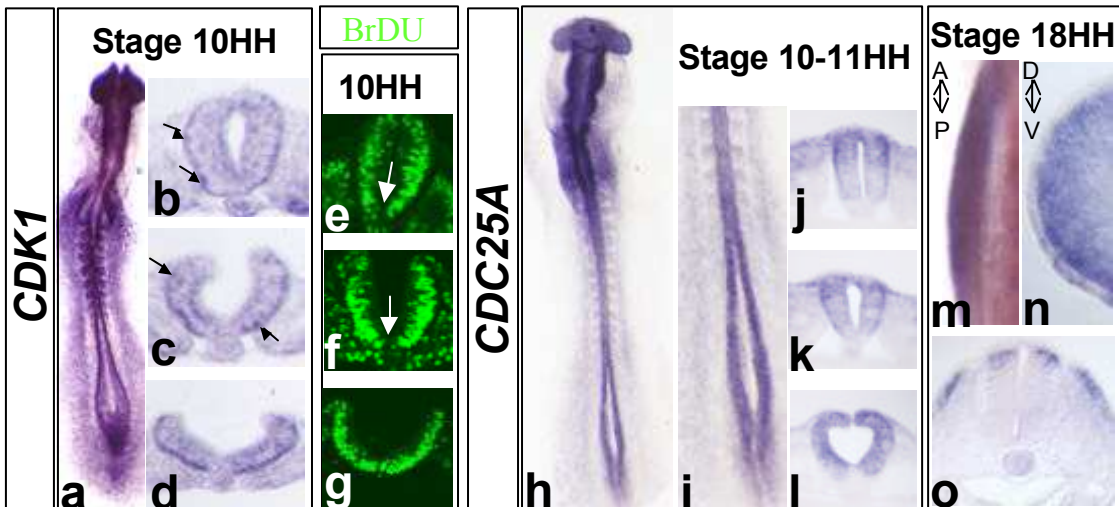


Figure 2: Regulators at the G2-M transition other than *CDC25B* are not restricted to domains of Shh activity

a-d: *CDK1* expression visualised by *in situ* hybridisation. a, dorsal view of a stage-10 embryo; b, d: cross-sections of a; *CDK1* is ubiquitously expressed with scattered cells expressing higher levels (arrows in b and c).

e-g: Immunostaining showing BrdU incorporation in cross-sections of a stage-10 embryo. Note the lower density at the midline, where the floor plate is differentiating (white arrows).

h-o: *CDC25A* expression visualised by *in situ* hybridisation in chicken embryos. h, i: dorsal views of a stage 10-11 embryo; i, is a higher magnification of the caudal region in h; j, k, l: cross-sections of h; note that the expression pattern in the neural tube is roughly complementary to that of *CDC25B* (compare with Fig.1 d-h); m, dorsal view of the wing bud in a stage-18 embryo (the double arrow marks the antero(A)-posterior(P) axis); cross section of the same embryo showing the expression along the dorso(D)-ventral(V) axis (double arrow) and the gradient of expression along the proximo-distal axis (proximal is to the right, distal to the left). Cross sections are oriented dorsal to the top in all panels

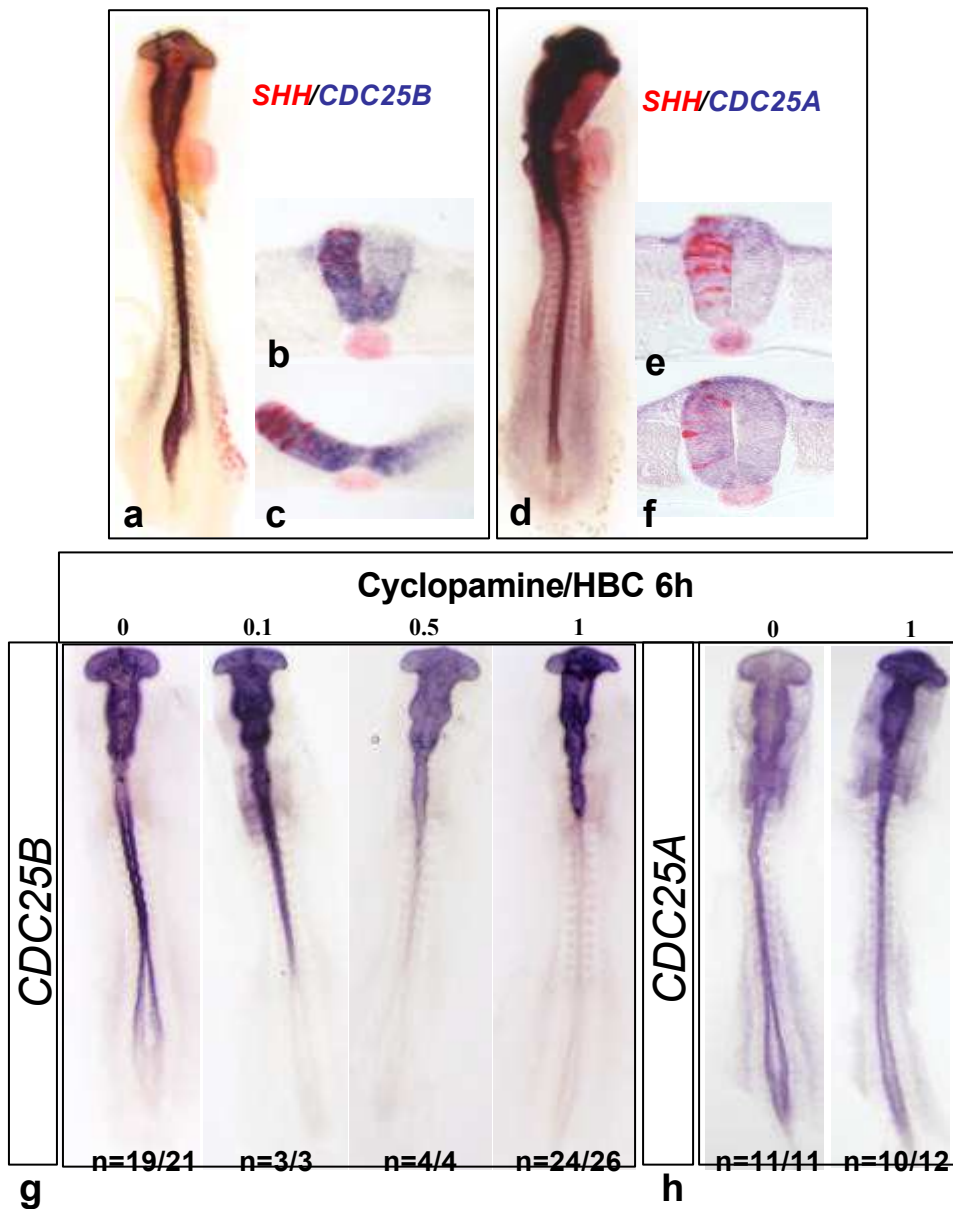


Figure 3: Modulating *Shh* signalling strongly affects *CDC25B* expression

a-c: Misexpression of *Shh* (in red) in the neural groove and neural tube leads to an up-regulation of *CDC25B* (in blue) within 6 hours. The effect is non-cell-autonomous, since only a few *Shh*-expressing cells are sufficient to induce *CDC25B* up-regulation throughout the electroporated neuroepithelium.

d-f: Misexpression of *Shh* in the neural tube has little or no effect on *CDC25A* expression.

b,c, and e,f are, respectively, cross-sections through a and d.

g: dorsal views of whole-mount stage-10-11 embryos treated for 6 hr with increasing concentrations of cycloamine ($\mu\text{g/ml}$; as indicated above the photos) and analysed for *CDC25B* expression by *in situ* hybridisation. h: In contrast, cycloamine treatment has no effect on *CDC25A* expression.

n, represents the number of embryos showing a staining equivalent to that on the picture/ the total number of embryos analysed.

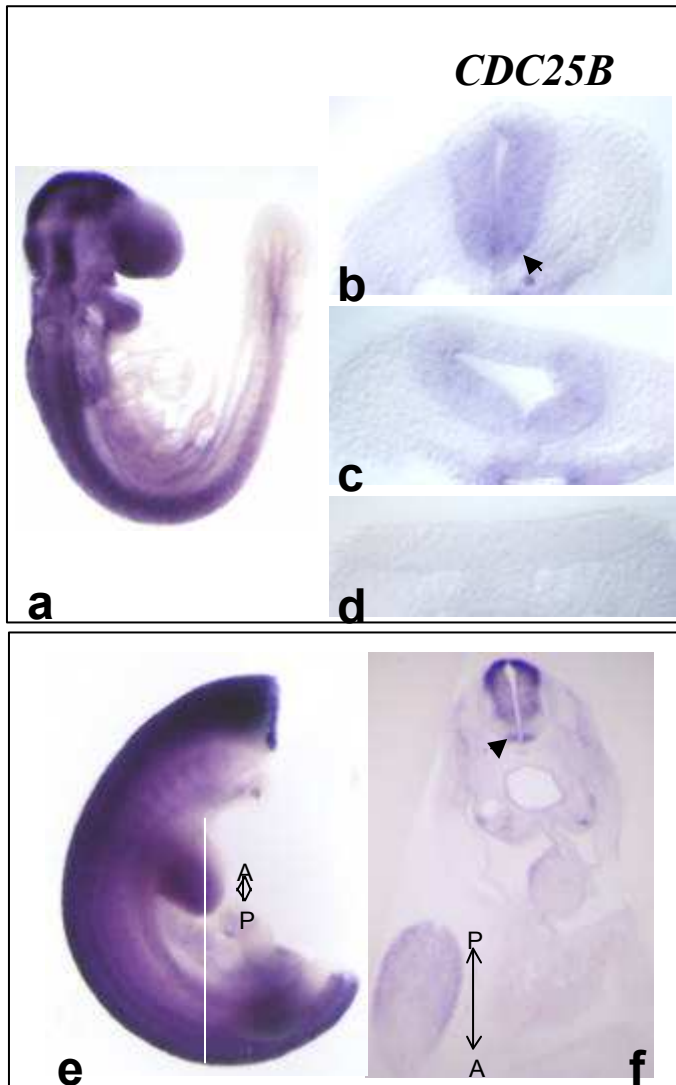


Figure 4 : *CDC25B* also displays a developmentally restricted expression pattern in the mouse embryo

a-d: *CDC25B* expression visualised by *in situ* hybridisation in a 9-d.p.c mouse embryo. a, lateral view of the embryo; b, c, d: cross-sections of a; Note the absence of staining in the caudal neuralepithelium (a, d); the staining appears in the closing neural groove (c) and is absent from the most dorsal aspect of the neural tube (b). Some scattered cells display a higher level of staining (arrows in b).

e, lateral view of a 10.5-dpc embryo (the head has been removed); *CDC25B* is expressed in the neural tube and in the posterior part of the limb bud.

f, cross section performed at the level of the white line in e; note that the section has been rotated along the vertical axis compared to the embryo in (e), the spinal cord is now at the top and the antero-posterior axis of the limb bud is as indicated by the double arrow. Note the staining in the posterior, but not anterior, region of the limb bud. *CDC25B* is also strongly expressed in the dorsal spinal cord and in a discrete domain flanking the floor plate (arrow).

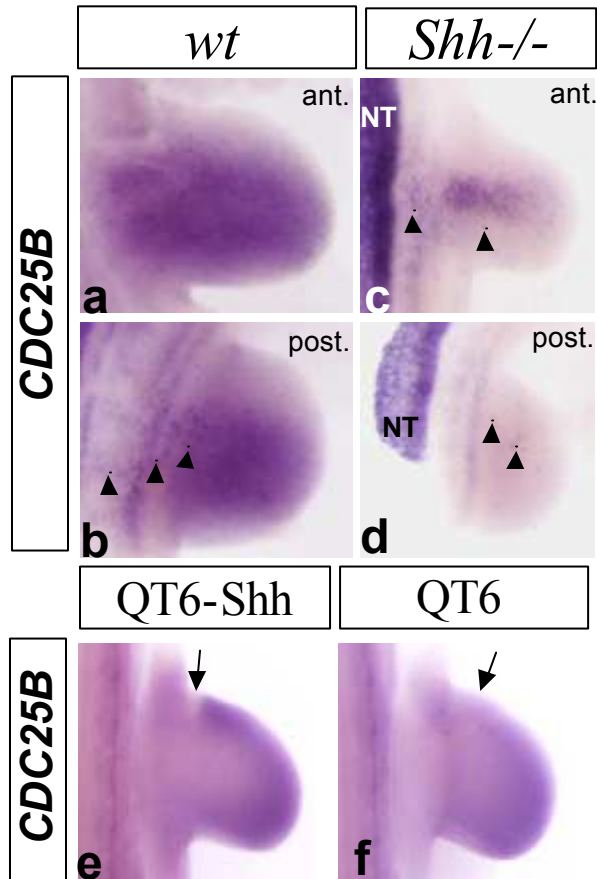


Figure 5 : *CDC25B* responds to *Shh* signalling in the limb bud of both mouse and chicken embryos
a-d: *CDC25B* expression is strongly reduced in the limb bud of *Shh*^{-/-} embryos. While *CDC25B* is still present in the neural tube (NT) of *Shh*^{-/-} embryos (c, d), the posterior domain of *CDC25B* expression, clearly detectable in the limb bud of wt littermates or heterozygous embryos (a, b), is absent in the mutants (c, d). Interestingly, scattered cells expressing *CDC25B* are visualized in the limb bud of both wild type (a, b, arrows) and mutant embryos (c, d, arrows).
e-f: Grafting cells expressing *Shh* (arrow in e) induces a clear upregulation of *CDC25B* within 6hr in the anterior part of the limb bud. Implanting a pellet of the corresponding control cells at the anterior margin of the limb bud has no effect (arrow in f).

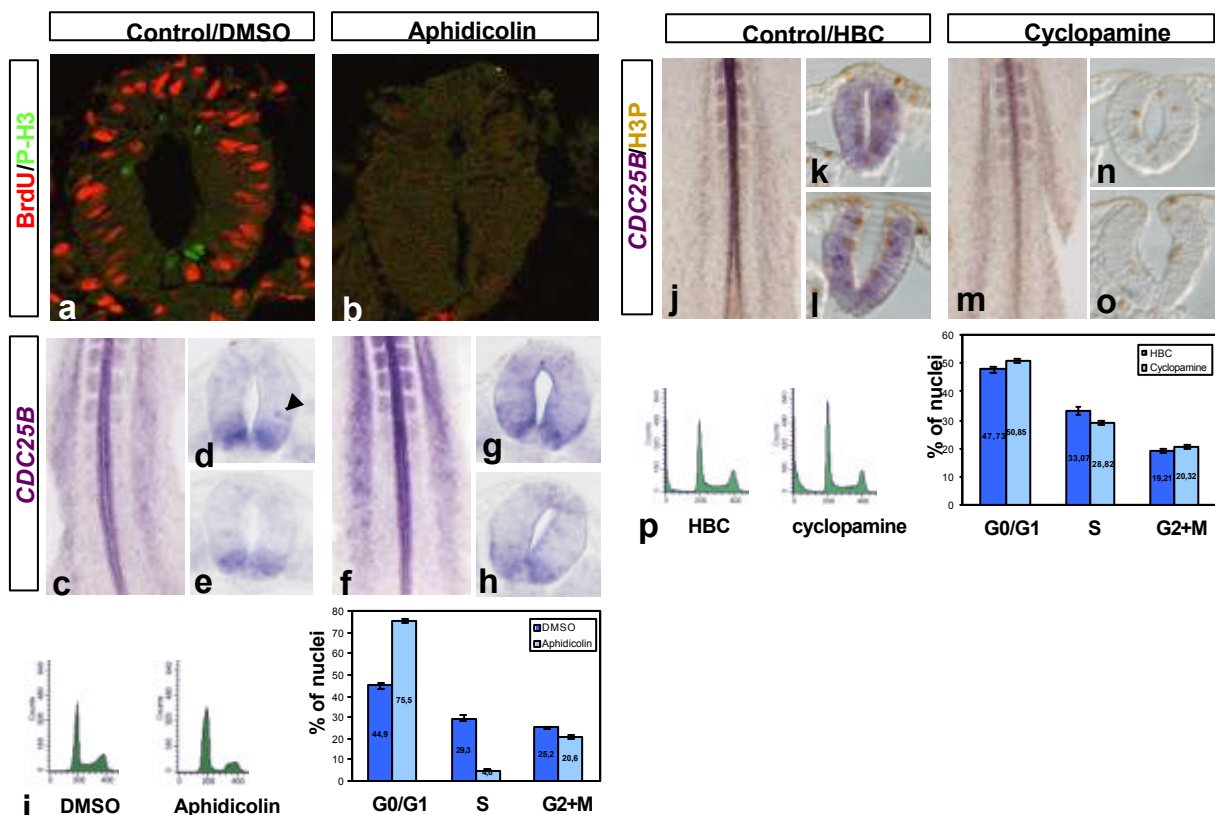


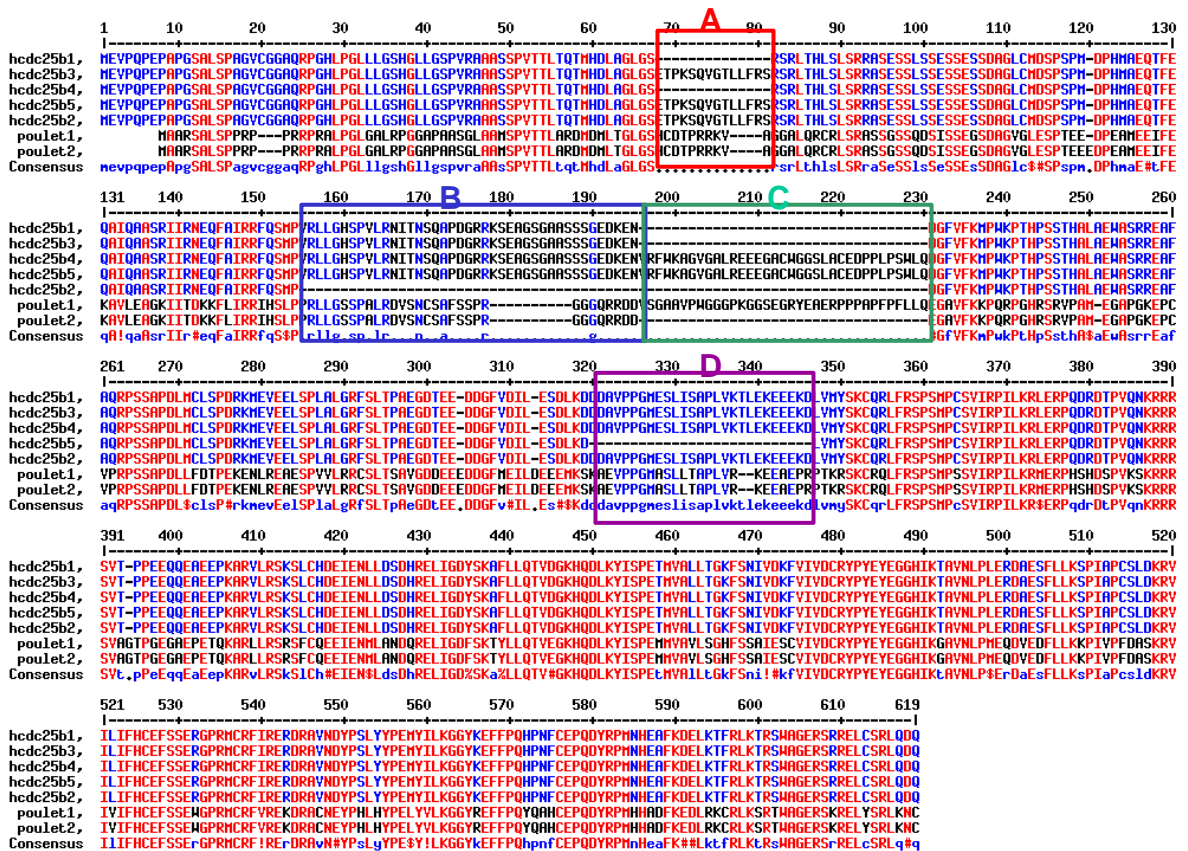
Figure 6 : Effect of cell cycle arrest on *CDC25B* transcription

a-b: Cross-sections of neural tubes of stage-10-11 embryos treated for 3 hr with DMSO or aphidicolin and analysed for BrdU labelling (red) and P-H3 immunostaining (green).

c-h: *CDC25B* expression visualised by *in situ* hybridisation in DMSO- (c-e) and aphidicolin- (f-h) treated embryos. c,f: dorsal view of a stage-11 embryo; d-e, g-h: cross-sections respectively of c and f; note the ventral expression in the neural tube of both control and treated embryos. A single cell expressing *CDC25B* is clearly visible outside the ventral domain of expression in d (arrowhead). The staining is stronger in aphidicolin-treated embryo.

i: Representative DNA profiles of DMSO- or aphidicolin- treated neural cells: three neural tubes were dissected from control or treated embryos, pooled and proceeded for flow cytometric DNA analysis. The cell cycle profile was quantified using ModFit software and histogram represents the mean \pm SEM (6 independent samples for each condition) of the percentage of cells in the different phases of the cell cycle. j-o: *CDC25B* expression visualised by *in situ* hybridisation (blue) and P-H3 visualised by immunodetection (brown) in embryos treated for 6 hr with HBC (j-l) or cyclophamide (m-o). j,m: dorsal view of a stage-10 embryo; k-l, n-o: cross-sections respectively of j and m; note the presence of P-H3 positive cells in the cyclophamide-treated embryo (n,o).

p: Representative DNA profiles of HBC- or cyclophamide- treated neural cells. Analysis was performed as described in i. Histogram represents the mean \pm SEM of 9 independent samples for each condition.



A

Isoformes	Domaines			
	A	B	C	D
b1 humaine	-	+	-	+
b2 humaine	+	-	-	+
b3 humaine	+	+	-	+
b4 humaine	-	+	+	+
b5 humaine	+	+	+	-
b6 ? poulet	+	+	+	+
B b3 poulet	+	+	-	+

Figure 20 : Comparaison des isoformes de CDC25B isolées dans le tube neural de poulet avec les isoformes humaines de CDC25B.

A) Les séquences des cinq isoformes humaines de CDC25B ont été alignées avec les isoformes de CDC25B isolées à partir du tube neural de poulet. La première isoforme de poulet semble contenir les quatre domaines qui sont alternativement présents dans les isoformes humaines. La deuxième isoforme semble contenir le domaine A, B, et D il pourrait s'agir de l'orthologue de CDC25B3 humaine.

C/ Résultats supplémentaires liés au deuxième article.

a) Caractérisation des isoformes de *CDC25B* présentes dans le tube neural de poulet.

Les phosphatases de type CDC25 sont composées d'un domaine catalytique dans leur partie carboxy-terminale et d'un domaine régulateur dans leur partie amino-terminale. Dans plusieurs espèces et notamment chez l'homme il existe plusieurs isoformes de CDC25B issues de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. Ces variants d'épissage diffèrent par la présence de quatre domaines (A à D) situés dans la partie régulatrice amino terminale de la phosphatase. Ainsi chez l'homme, le variant B1 possède les domaines B et D, le variant B2 possède les domaines A et D, le variant B3 possède les domaines A, B et D, le variant B4 possède les boîtes B, C et D et enfin, le variant B5 possède les boîtes A, B et C (Figure 20A,B). Nous avons clonés deux ADNc distincts codant pour des phosphatases de type CDC25B à partir de messagers de tube neural d'embryons de poulet âgés de deux jours.

L'analyse de séquence montre que les deux protéines correspondant aux ADNc clonés présentent une homologie plus forte avec les protéines CDC25B qu'avec CDC25A ou C suggérant que nous avons cloné l'orthologue de CDC25B (données non montrées). Cette analyse montre cependant que les protéines de poulet et d'humain ne sont pas fortement conservées. La conservation est d'environ 69% en acides aminés dans la partie catalytique et de 44% dans la partie régulatrice (Figure 20A). L'existence de deux transcrits distincts suggère que, comme chez l'homme, il existe différents variants d'épissage du gène *CDC25B* de poulet. Pour tenter d'identifier à quels variants humains pourraient correspondre les deux protéines de poulet, nous avons comparés leurs séquences avec les séquences des différents variants humains. Nous avons par la suite localisés sur leurs séquences les 4 domaines qui correspondent aux positions des domaines A, B, C et D alternativement présents dans les variants humains. Il est à noter que les domaines correspondant aux domaines C et A humains sont peu ou pas conservés chez le poulet (Figure 20A). Les deux protéines de poulet diffèrent par la présence ou l'absence d'un domaine positionné de manière analogue au domaine C humain suggérant qu'un épissage alternatif de cette boîte existe aussi chez le poulet. Nous proposons donc que la protéine de poulet qui n'a pas l'équivalent du domaine C et qui semble posséder les autres boîtes potentielles puisse correspondre à l'isoforme CDC25B3 humain. L'autre protéine pourrait constituer un nouveau type de variant qui contiendrait les quatre domaines potentiels (Figure 20B).

Une analyse bioinformatique réalisée à partir des banques d'EST de poulet montre qu'il existe au moins un autre variant de *CDC25B* qui ne possède pas l'équivalent de la boîte D. L'information que nous apporte cette analyse ne permet pas de savoir si ce variant possède ou pas les domaines A, B ou C. Ce variant pourrait cependant correspondre à l'isoforme B5 qui est le seul variant humain à ne pas posséder de domaine D. Une analyse par RT-PCR montre que ce variant est aussi présent dans le tube neural de poulet (données non montrées). Chez le poulet il existe donc des isoformes de *CDC25B* qui diffèrent par la présence ou l'absence des boîtes C ou D. L'existence d'autres variants qui n'auraient pas les domaines équivalents aux boîtes A ou B humaines n'a pas été établie.

L'ensemble de ces données montre qu'il existe plusieurs variants de *CDC25B* exprimés dans le tube neural de poulet : un variant qui ne possède pas la boîte C et qui pourrait correspondre à *CDC25B3* humaine, un autre qui possède l'ensemble des domaines équivalents aux boîtes A, B, C et D et enfin une isoforme qui ne possède pas le domaine D.

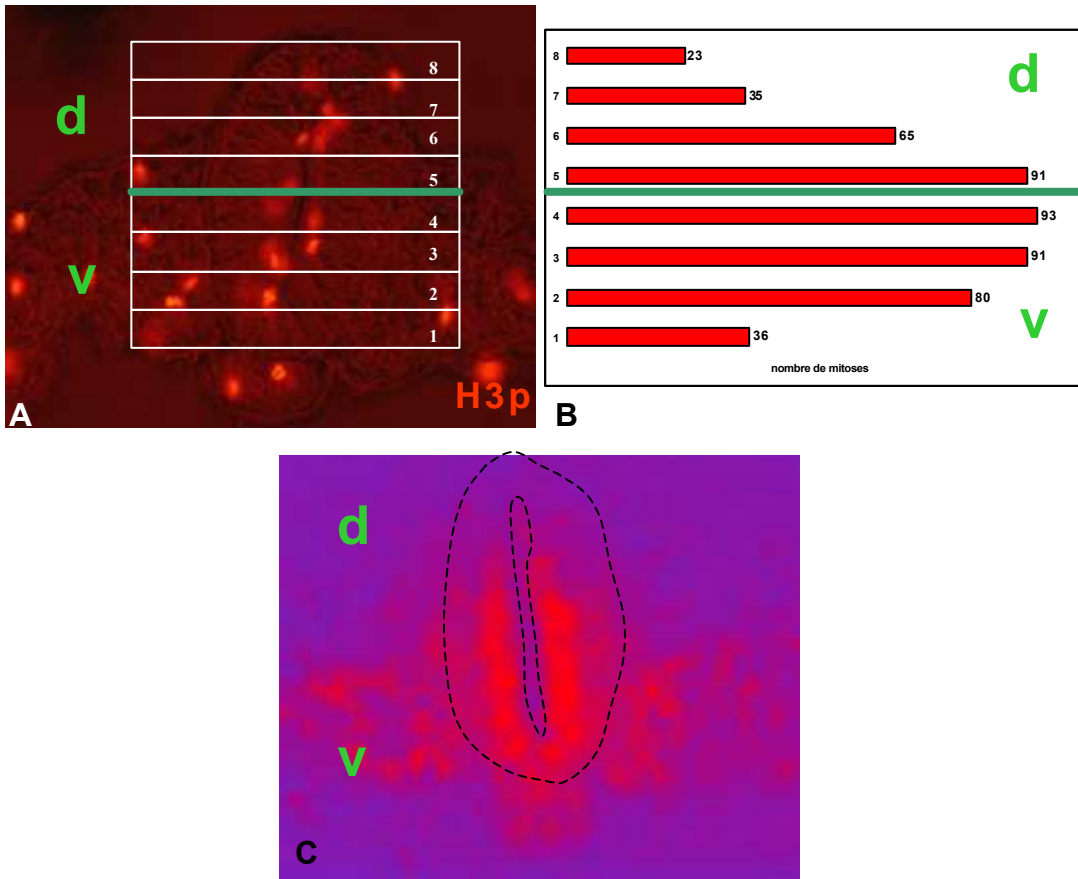


Figure 21 : Analyse de la densité mitotique selon l'axe dorso-ventral dans le tube neural d'un embryon de stade 13 HH .

A) Immunodétection de l'antigène H3P. Le tube neural est subdivisée en huit segments selon l'axe dorso-ventral.les segments 1 à 4 sont les segments ventraux et les segments 5 à 8 sont les segments dorsaux. B) Comptabilisation des mitoses selon l'axe dorso ventral dans les 8 zones délimitées en A.L'analyse est effectuée sur la partie caudale d'un embryon au stade 13 HH, 41 coupes sériées ont été analysées et 513 cellules positives pour le marqueurs H3P ont été comptées. Le nombre de mitoses cumulées est plus important dans les segments correspondant à la partie ventrale du tube (2,3,4) par rapport aux segments correspondant à la partie dorsale (5,6,7). C) Image virtuelle représentant la projection de l'ensemble des images d'immunodétection H3P. La densité de mitoses cumulées est plus importante en partie ventrale par rapport à la partie dorsale. d correspond à la partie dorsale, v à la partie ventrale.

b) Analyse de la densité mitotique selon l'axe dorso-ventral du tube neural.

Afin de savoir si l'expression de *CDC25B* dans la partie ventrale du tube neural était corrélée avec des propriétés particulières des précurseurs neuraux dans le cycle nous avons voulu analyser le comportement des cellules en mitose dans le tube neural ventral. Des données de la littérature rapportaient qu'à des stades précoces du développement la densité mitotique était globalement plus importante dans la partie ventrale du tube neural que dans la partie dorsale. Ces observations avaient été effectuées par comptage des figures mitotiques en fonction d'unité de surface (Corliss and Robertson, 1963). Afin de savoir si nous étions capables de quantifier et visualiser une différence de nombre de cellules en mitose, entre région ventrale et région dorsale du tube neural, nous avons effectué le même type d'analyse après immunodétection des cellules en mitose à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'Histone 3 Phosphorylée (H3P). Notre analyse a été réalisée sur des coupes transversales de tube neural situées au niveau du mésoderme pré-somitique et du somite néoformé d'un embryon au stade 13HH. Cette région du tube neural a été décrite dans l'analyse préalable comme comportant une densité mitotique plus importante en ventral qu'en dorsal, de plus elle correspond à un domaine de forte expression ventrale de *CDC25B*.

Pour effectuer notre analyse nous avons délimité huit zones de taille équivalente selon l'axe dorso-ventral du tube neural et avons comptabilisé le nombre de mitoses pour chacune de ces zones (figure 21A). Le cumul des comptages qui ont été effectués sur 41 coupes sériées montre que les zones les plus dorsales (zone 8) et ventrales (zone 1) du tube neural qui correspondent à la plaque du toit et la plaque du plancher présentent un plus faible nombre de mitoses que le reste du tube neural (figure 21B). L'analyse des autres zones montre que le nombre de mitoses est plus élevé dans les zones ventrales que dans les zones dorsales : 264 au total pour les zones 2 à 4 versus 191 pour les zones 5 à 7 (figure 21B). Cette différence de nombre de mitoses entre la partie ventrale et la partie dorsale peut aussi être visualisée lors d'une projection informatique de la totalité des images d'immunodétection H3P sur coupe transversale. En effet, sur cette image nous visualisons un cumul des marquages laissant apparaître une densité de mitoses plus forte dans la partie ventrale que dans la partie dorsale (figure 21C).

Ces résultats confirment que dans la région analysée, la densité mitotique est plus importante dans la partie ventrale que dans la partie dorsale du tube neural. Cette densité mitotique plus importante est corrélée avec l'expression ventrale de *CDC25B*.

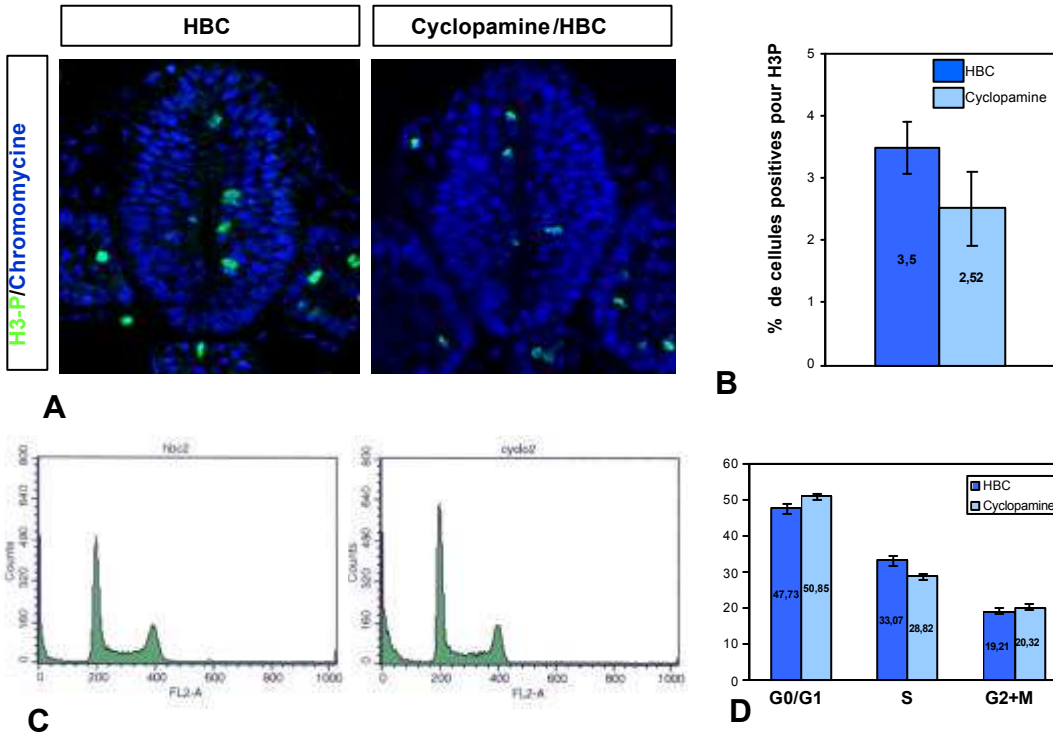


Figure 22 : Analyse de l'effet de l'inhibition de la voie Shh sur la mitose et la répartition de des précurseurs neurax dans le cycle cellulaire.

A-B) Analyse de l'effet de l'inhibition de la voie Shh sur la proportion de cellules en mitose. A) Immunodétection H3P (vert) et marquage nucléaire à la chromomycine (bleu) sur coupe transversale de tube neural. A gauche l'échantillon contrôle (HBC) et à droite l'échantillon traité (cyclopamine). B) Quantification du pourcentage de cellules H3P dans des conditions de traitement à la cyclopamine (gauche) et dans des conditions contrôles (droite). Après 7-8 heures de traitement à la cyclopamine nous observons une diminution des cellules en mitose dans l'échantillon traité par rapport à l'échantillon contrôle.

c) Analyse de l'influence de la voie de signalisation Shh sur la transition G2 /M dans les précurseurs neuraux.

L'expression de *CDC25B* dans le tube neural dépend de l'activité de la voie de signalisation Shh. De plus, cette expression peut être corrélée à des domaines qui présentent une densité mitotique plus élevée en partie ventrale qu'en partie dorsale. La phosphatase CDC25B agit sur l'entrée en mitose en activant le complexe CDK1/Cycline B (Kristjansdottir and Rudolph, 2004). Dans ce contexte, nous avons donc émis l'hypothèse que la voie de signalisation Shh pourrait influencer l'entrée en mitose en régulant l'expression de *CDC25B*. Pour savoir si la signalisation Shh pouvait influencer l'entrée en mitose des précurseurs neuraux nous avons bloqué cette voie et nous avons analysé le pourcentage de cellules positives pour le marqueur H3P. Nous avons choisi de travailler sur des temps de traitement courts car des traitements plus longs induisent un changement de polarité dorso-ventrale qui pourrait affecter indirectement le cycle cellulaire (Incardona et al., 1998).

Après 7 à 8 heures de traitement à la cyclopamine le pourcentage de cellules positives pour le marqueur H3P dans le tube neural diminue de 3.5% dans des conditions contrôle à 2.52% dans les embryons traités à la cyclopamine (figure 22 A, B). Etant donné que *CDC25B* est préférentiellement exprimé dans la partie ventrale du tube neural, nous aurions pu penser que la réduction de mitose serait plus importante dans cette région du tube. En réalité la diminution du nombre de mitose que nous observons ne semble pas spécifique de la partie ventrale du tube neural. Ce résultat suggère donc que la voie de signalisation Shh pourrait agir sur le taux de cellules en mitose à la fois dans la partie ventrale et dorsale du tube neural. La diminution de l'index mitotique pourrait cependant ne pas être liée à un effet de la voie à la transition G2/M. En effet, une des fonctions connue de la voie de signalisation Shh dans le tube neural est de contrôler la survie des précurseurs neuraux (Thibert et al., 2003). La diminution de mitose que nous observons pourrait donc être liée à un phénomène de mort cellulaire. L'analyse après traitement à la cyclopamine montre que certains embryons ont un fort taux de cellules en apoptose. Cependant, nous observons une diminution des cellules en mitose dans des embryons traités qui ne présentent pas de mort cellulaire anormalement élevé de (marquage Caspase 3 activée) suggérant que la diminution de l'index mitotique n'est pas due à un phénomène d'apoptose (Emilie Peco, données non montrées). Comme la voie de signalisation Shh affecte la prolifération cellulaire en régulant positivement l'expression de la *Cyclines D1* qui est connue pour stimuler la progression des cellules en phase G1, il est aussi

possible que l'effet que nous visualisons sur les mitoses soit la conséquence d'un ralentissement des cellules dans cette phase. Nous avons donc analysé les paramètres du cycle cellulaire d'explants de tube neural dans les conditions où nous observons une diminution du marquage H3P. Cette analyse a été effectuée par cytométrie de flux après un traitement à la cyclopamine d'une durée de 7 à 8 heures. L'analyse des profils de cytométrie de flux ne montre que de faibles différences des paramètres du cycle cellulaire entre les échantillons traités à la cyclopamine (n=9 échantillons de 3 tubes neuraux chacun) et les échantillons contrôles (n=9 échantillons de 3 tubes neuraux chacun) (figure 22 C). Ces résultats montrent que le blocage de la voie de signalisation n'a pas un effet drastique sur les paramètres du cycle cellulaire en comparaison à un blocage du cycle à l'aphidicoline (cf. article). La quantification de ces résultats montre que le pourcentage de cellules en G1 est plus important (50.8 %) dans les conditions de traitement à la cyclopamine par rapport aux conditions contrôles (47.7 %). Par contre le pourcentage de cellules en S diminue dans les embryons traités (28.8%) par rapport aux témoins (33%) (figure 22D). En accord avec son rôle connu de régulation positive des Cyclines D l'inhibition de la voie pourrait donc ralentir la progression des cellules en G1 provoquant une accumulation des cellules dans cette phase et ainsi diminuer la proportion de cellules en phase S. Le pourcentage de cellules en G2+M n'est pas significativement différent entre embryons traités (20.3%) et témoins (19.2%) (figure 22D). Le fait que nous n'observons pas de réduction de la proportion de cellules en phase G2+M alors que nous observons une diminution des cellules positives pour le marqueur H3P laisse suggérer une légère accumulation de cellules en phase G2 en condition de traitement à la cyclopamine. Il semble donc peu probable que la diminution du nombre de cellules en mitose que nous observons ne soit que la conséquence d'un ralentissement de la progression des cellules en début de cycle. L'ensemble de ces données suggère donc que la signalisation Shh pourrait agir positivement à la transition G2/M sur les précurseurs du tube neural.

La diminution de l'index mitotique en condition où la voie Shh est inhibée est à la fois minime et variable selon les embryons analysés (figure 22D). Ceci pourrait être dû en partie à des variations d'efficacité des traitements à la cyclopamine. L'action de la voie de signalisation Shh à la transition G2/M reste donc à confirmer par d'autres approches expérimentales.

De plus, nous n'avons pas été en mesure d'établir de corrélation stricte entre la diminution de l'expression de *CDC25B* et la diminution de l'index mitotique dans les embryons traités à la cyclopamine. En effet, nous avons observé le cas d'un embryon présentant une diminution du taux de transcrits *CDC25B* sans réduction de l'index mitotique.

Dans ce cas il est possible que le taux de protéine CDC25B résiduelle soit suffisante pour permettre la transition G2/M. Il est aussi possible que la diminution de l'expression de *CDC25B* ne soit pas suffisante pour permettre une inhibition significative de l'index mitotique. Nous ne pouvons donc pas exclure que dans ce contexte d'autres mécanismes moléculaires soient nécessaires à la régulation de la transition G2/M par Shh.

DISCUSSION

1/ L'expression de *Cycline D2* fait partie du programme caudalisant médié par la signalisation FGF.

La voie de signalisation FGF contrôle le développement de la partie postérieure de l'embryon. Plusieurs FGFs, et notamment le FGF8, sont exprimés dans la région caudale des embryons de Vertébrés (Bertrand et al., 2000; Crossley and Martin, 1995). Des allèles hypomorphes du *FGF8* induisent chez la souris des défauts dans le développement postérieur de l'embryon (Meyers et al., 1998). Dans le système nerveux, la signalisation FGF permet l'allongement continu de la structure en maintenant un groupe de cellules souches situées à proximité du nœud de Hensen pendant sa régression (Mathis et al., 2001). Le maintien par le FGF des cellules de la plaque et la gouttière neurale dans un état immature se traduit par l'expression de facteurs de transcription particuliers, et l'absence de différenciation neuronale.

Dans ce travail nous montrons que l'expression de *Cycline D2* est régulée positivement par la voie de signalisation FGF dans la plaque neurale incluant ainsi un régulateur positif de la progression en phase G1 dans son programme de caudalisation. La voie de signalisation FGF pourrait réguler l'expression de la *Cycline D2* par l'intermédiaire de la voie Ras/MAPK car cette voie est connue pour réguler l'expression de Cyclines D afin de permettre la progression en phase G1 du cycle en réponse aux signaux extra-cellulaires (Coleman et al., 2004). La *Cycline D2* est aussi connue pour être une cible des protéines Glis (Yoon et al., 2002). De manière intéressante *Gli2* est induit par la signalisation FGF dans le mésoderme chez le xénope (Brewster et al., 2000). La signalisation FGF pourrait donc réguler l'expression de la *Cycline D2* par l'intermédiaire de *Gli2*.

Nous avons observé que des délétions de mésoderme n'avaient pas d'effet sur l'expression de *Cycline D2* dans la partie la plus caudale du neuroépithélium. La plaque neurale caudale exprime le *FGF8*, il est donc possible que la signalisation FGF soit responsable de l'expression de la *Cycline D2* dans cette région. D'autre part, *Wnt3A* qui régule positivement l'expression de *Cycline D2* (Megason and McMahon, 2002) est aussi exprimé dans la plaque neurale caudale (Cauthen et al., 2001) et pourrait donc réguler positivement l'expression de ce gène.

La voie de signalisation FGF est connue pour réguler la prolifération dans différentes régions céphaliques (pour revue voir (Dono, 2003)). Il a été montré que le FGF2 augmente la proportion de progéniteurs neuraux dans le cortex embryonnaire ce qui provoque une augmentation de taille du cerveau adulte (Vaccarino et al., 1999). Le FGF8 et le FGF17 régulent la prolifération et la différenciation des structures cérébrales médianes du cervelet. En

effet, la perte de fonction du *FGF 17* diminue la prolifération des précurseurs neuraux du cervelet. Ce phénotype est accentué par la perte de fonction d'un allèle du *FGF8* démontrant que les deux facteurs coopèrent dans la régulation de la prolifération du pool de précurseurs neuraux du cervelet. De manière intéressante, la diminution de la signalisation FGF entraîne aussi la différenciation prématurée des cellules de Purkinje selon l'axe rostro médial (Xu et al., 2000).

Les cellules de la partie caudale du neuroépithélium sont en prolifération et ne se différencient pas (Diez del Corral et al., 2002; Sechrist and Bronner-Fraser, 1991). Nous montrons que la signalisation FGF maintient l'expression de *Cycline D2* dans la gouttière et la plaque neurale. De plus, l'expression forcée de *Cycline D2* dans le tube neural, favorise la prolifération cellulaire et inhibe la différenciation neuronale. Nous proposons donc que dans la plaque et la gouttière neurale la Cycline D2 agit en effecteur du maintien d'un état immature médié par le FGF en maintenant les précurseurs neuraux dans le cycle cellulaire.

2/ L'expression de *Cycline D1* est régulée par la voie de signalisation Shh.

Dans le tube neural la voie de signalisation Shh contrôle la spécification des précurseurs neuraux ventraux. Le morphogène Shh produit par la corde et la plaque du plancher va établir différents domaines de précurseurs neuraux desquels vont émerger chaque classe de neurones différenciés. Les domaines de précurseurs sont caractérisés par une combinatoire spécifique d'expression de facteurs de transcription. Les gènes de classe I (*Pax7*, *Dbx1*, *Dbx2*, *Irx3* et *Pax6*) sont réprimés par Shh alors que les gènes de classe II (*Nkx6.1*, *Olig2*, *Nkx2.2*, et *Nkx2.9*) sont activés par cette voie de signalisation (Briscoe and Ericson, 2001; Jacob and Briscoe, 2003). L'expression de ces facteurs de transcription débute au niveau de la gouttière neurale de manière concomitante avec l'extinction du programme transcriptionnel caudal. Ainsi le FGF exerce une forte activité répressive sur les gènes de classe I et une faible activité répressive sur les gènes de classe II (Bertrand et al., 2000; Diez del Corral et al., 2003; Novitch et al., 2003). Dans ce travail nous montrons que l'expression de *Cycline D1* débute dans la gouttière neurale. L'expression de ce gène est faiblement réprimée par le FGF alors qu'elle est induite par Shh. Les mécanismes de régulation *Cycline D1* par le FGF et Shh sont donc les mêmes que les mécanismes de régulation des facteurs de transcription de classe II. L'expression du gène codant pour la Cycline D1 est donc coordonnée avec les mécanismes de maturation de l'ébauche de moelle épinière suggérant

que ce régulateur du cycle cellulaire fait partie intégrante du programme de développement de la partie ventrale du tube neural.

Dans les précurseurs des cellules granulaires du cervelet chez la souris l'action mitogène de Shh se fait par induction directe de *N-Myc* qui induit à son tour la *Cycline D1* (Kenney et al., 2003; Kenney and Rowitch, 2000; Oliver et al., 2003). Comme Shh est aussi capable de réguler *N-Myc* dans le tube neural de souris il est possible que l'action de Shh sur la *Cycline D1* que nous observons se fasse par l'intermédiaire de *N-Myc* (Kenney et al., 2003). La signalisation Shh est nécessaire à la prolifération des régions diencephalique et mésencéphalique durant des étapes plus précoces du développement. La diminution de prolifération de ces régions dans un embryon mutant pour le gène Shh s'accompagne d'une baisse d'expression du gène *Cycline D1*. Dans ce contexte, il est proposé que la signalisation Shh régule indirectement l'expression de *Cycline D1* en activant un signal capable d'induire la compétence des précurseurs neuraux à répondre à des signaux de type Wnt sécrétés par les régions dorsales du mésencéphale et du diencephale (Ishibashi and McMahon, 2002). Nous avons montré que l'expression de *Cycline D1* débute au niveau de la gouttière puis s'étend au niveau du pré-tube neural avant d'être restreinte aux parties dorsales du tube neural. Cette expression dorsale de la *Cycline D1* est dépendante de la signalisation Shh puisque en condition de traitement à la cyclopamine nous n'observons plus de transcrit dans l'ensemble du tube neural. Dans ce contexte l'initiation de l'expression de *Cycline D1* dans la gouttière neurale semble dépendante de la signalisation Shh alors que son maintien dans la partie dorsale du tube neural pourrait être régulé par de facteurs de types Wnt. En effet, *Wnt1* et *Wnt3A* sont exprimés dans la partie dorsale du tube neural au moment de sa fermeture (Cauthen et al., 2001). La voie de signalisation Wnt β -caténine contrôle directement l'expression de la *Cycline D1* via la β caténine et les facteurs de transcription LEF/TCF (Tetsu and McCormick, 1999). Dans le tube neural, la croissance de la partie dorsale est dépendante de la signalisation Wnt qui régule l'expression des *Cyclines D1* et *D2* (Megason and McMahon, 2002). Il semble néanmoins qu'au niveau de la gouttière neurale et du pré-tube neural la voie de signalisation Shh pourrait coordonner le programme de spécification et la progression dans le cycle cellulaire des précurseurs neuraux en régulant positivement l'expression de la *Cycline D1*.

3/ Les Cyclines D favorisent la prolifération des précurseurs neuraux au détriment de leur différenciation.

L'analyse fonctionnelle que nous avons effectuée montre que le maintien des Cyclines D1 et D2 favorise la prolifération des précurseurs neuraux au détriment de leur différenciation. En accord avec ces résultats l'électroporation d'une forme dominante négative des Cyclines D dans le tube neural de poulet réduit l'expansion des précurseurs neuraux (Megason and McMahon, 2002). Plusieurs données de perte de fonction chez la souris montrent que les *Cyclines D* sont impliquées dans le contrôle de la prolifération des précurseurs neuraux dans des régions restreintes du système nerveux central. En effet, la perte de fonction de la Cycline D1 entraîne un défaut de prolifération des précurseurs neuraux au niveau de la rétine (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995). Les souris mutantes pour le gène de Cycline D2 montrent un défaut de prolifération des cellules granulaires du cervelet, et un défaut de neurogenèse chez l'adulte (Huard et al., 1999; Kowalczyk et al., 2004). L'analyse de ces mutants n'a pas permis de mettre en évidence de défaut de développement de la moelle épinière suggérant qu'il pourrait exister des phénomènes de redondances fonctionnelles entre les différentes Cyclines D. Des souris qui expriment une seule des trois Cycline D ont été générées. Dans ces embryons, l'expression de la seule Cycline D devient ubiquitaire permettant le développement normal de la grande majorité des tissus à l'exception de ceux où le taux d'expression de la Cycline D restante semble insuffisant (Ciemerych et al., 2002). D'autre part, les phénotypes des souris mutantes pour le gène *Cycline D1* sont partiellement sauvés dans des mutants où le gène de la *Cycline D2* a été introduit dans le locus de la *Cycline D1* (Carthon et al., 2005). Ces données suggèrent qu'il existe bien des phénomènes de compensation par redondance fonctionnelle entre les différentes Cycline D. Cependant des données récentes montrent que les souris triples mutantes *Cycline D1*^{-/-}, *D2*^{-/-}, *D3*^{-/-} semble se développer normalement jusqu'au 13^{ème} jour de développement. L'analyse détaillée de ces mutants montre que la majorité des types cellulaires sont capables de proliférer normalement sans Cycline D (Kozar et al., 2004). Des résultats similaires ont été observés pour les souris double mutantes *CDK4*^{-/-}; *CDK6*^{-/-}. Il a cependant été montré qu'il existait des complexes *CDK2/Cyclines D* actifs dans les fibroblastes embryonnaire des souris *CDK4*^{-/-}; *CDK6*^{-/-}. *CDK2* qui est normalement associé à la Cycline E pourrait donc participer à la prolifération cellulaire dans ces souris mutantes en formant des complexes «anormaux» avec les Cyclines D (Malumbres et al., 2004). Ainsi il semble qu'en plus des phénomènes de redondance fonctionnelle, l'embryon est capable de s'adapter aux modifications

expérimentales imposées en utilisant des stratégies de prolifération alternatives lui permettant de poursuivre son développement.

Dans cette étude nous montrons que la voie de signalisation FGF régule l'expression de la *Cycline D2* dans la plaque et la gouttière neurale alors que la voie de signalisation Shh régule l'expression de *Cycline D1* dans la gouttière et le pré-tube neural. La régulation de Cyclines D différentes par des voies de régulations distinctes suggère que chacune de ces molécules pourrait conférer des propriétés prolifératives particulières aux précurseurs neuraux. Cependant plusieurs données suggèrent que les deux Cyclines partagent les mêmes fonctions. Chez l'embryon de souris *Cycline D1* est préférentiellement exprimée dans la plaque neurale alors que *Cycline D2* est exprimée dans le tube neural (Wianny et al., 1998). L'expression différentielle de ces Cyclines au cours de la maturation de l'ébauche de moelle épinière est donc inversée entre souris et poulet suggérant que ces Cyclines pourraient agir de la même manière dans ces régions. D'autre part, l'étude des souris mutantes pour les Cyclines D suggère qu'il existe des phénomènes de redondance fonctionnelle entre ces molécules. Enfin, dans notre étude, les effets de la Cycline D1 et de la Cycline D2 observés sont très similaires suggérant que les fonctions de ces deux gènes soient redondantes au moins dans certaines de leurs fonctions.

Les Cyclines D sont connues pour stimuler la prolifération cellulaire en régulant l'activité des complexes kinases CDK4/6 favorisant ainsi la progression en phase G1 du cycle cellulaire (Ho and Dowdy, 2002). La kinase CDK6, partenaire potentiel des Cyclines D, est coexprimée avec les Cyclines D1 et D2 dans la plaque la gouttière et la partie dorsale du tube neural. L'électroporation d'une forme dominante négative de la Cycline D1 formant des complexes abortifs avec les kinases CDK4/6 réduit l'expansion des précurseurs neuraux du tube neural (Megason and McMahon, 2002). Ces données suggèrent donc que la fonction des Cyclines D1 et D2 que nous observons se fait *via* l'action de complexes CDK4/6/Cyclines D qui vont favoriser la progression des précurseurs neuraux dans la phase G1 du cycle cellulaire. L'expression de *Cycline D1* dans la gouttière neurale est concomitante avec la sortie du cycle cellulaire de certains précurseurs neuraux. De plus, à des stades plus tardifs les *Cyclines D1* et *D2* vont être exprimées dans des domaines distincts de précurseurs du tube neural (Valérie Lobjois, résultats non publiés). Bien que nous n'ayons pas effectué de relation au niveau cellulaire entre l'expression des *Cyclines D1* et *D2* et l'expression des marqueurs de sortie du cycle cellulaire il semble donc que ces gènes soient exprimés dans des domaines où certains précurseurs peuvent quitter le cycle. Les complexes CDK/Cyclines sont régulés négativement par des inhibiteurs de CDK (CKIs). Les CKIs de la famille des Ink4 inhibent les

complexes CDK4/6 en entrant en compétition avec les Cyclines D pour la liaison à la CDK. Les CKIs de type Cip/Kip agissent sur tous les complexes CDK/Cyelines en formant des complexes trimériques (Sherr and Roberts, 1999). La réalisation d'hybridation *in situ* pour *p15/Ink4b* et *p18/Ink4b* chez le poulet ne nous ont pas permis de mettre en évidence de domaines d'expression de ces gènes dans le neuroectoderme. En ce qui concerne les CKIs de type Cip/Kip, le gène *p27* est exprimé chez le poulet dans la gouttière neurale, puis dans le tube neural à des stades plus tardifs du développement (Valérie Lobjois, données non publiées). Plusieurs fonctions peuvent être envisagées pour la fonction de *p27* en relation avec l'expression des *Cyclines D1* et *D2*. En effet, il est proposé que la formation de complexes *p27/CDK4,6/Cyline D* puisse déplacer *p27* des complexes *CDK2/Cycline E* pour rendre ces complexes actifs. Dans la gouttière neurale *p27* pourrait donc maintenir des cellules en prolifération en permettant l'activation des complexes *CDK2/Cycline E*. D'autre part la fonction de *P27* pourrait être de favoriser la sortie du cycle cellulaire. Plusieurs études montrent que les CKIs jouent un rôle important dans la coordination entre prolifération cellulaire et différenciation neuronale (Ohnuma and Harris, 2003). Ainsi, il a été montré que la perte de fonction de *p27* chez le Xénope inhibe la différenciation des neurones primaires et augmente le nombre de précurseurs neuraux (Carruthers et al., 2003; Vernon et al., 2003). Il est donc également possible que des CKIs puissent permettre à certains précurseurs neuraux de quitter le cycle cellulaire en inhibant les complexes *CDK4/6 Cyclines D*. Dans les expériences de sur expression de *Cyclines D*, l'effet des CKIs est certainement contrebalancé par l'accumulation de complexes *CDK4/6/Cyclines D* actifs favorisant ainsi la prolifération cellulaire au dépend de la différenciation. L'équilibre entre les régulateurs positifs et négatifs de la progression en phase G1 du cycle cellulaire pourrait donc être un élément essentiel à la balance entre prolifération et différenciation des précurseurs neuraux.

4/ Régulation de l'expression des phosphatases CDC25 pendant le développement de l'ébauche de moelle épinière.

L'expression de *CDC25B* est connue pour être régulée au cours du cycle cellulaire. En effet, les transcrits *CDC25B* s'accumulent pendant la phase S et atteignent un niveau maximal d'expression au niveau de la phase G2 du cycle cellulaire avant de disparaître pendant la

phase G1 (Kakizuka et al., 1992). Dans cette étude nous montrons que pendant le développement embryonnaire, d'une part de forts taux d'expression de *CDC25B* sont corrélés avec des sites d'activité de la voie de signalisation Shh et d'autre part l'activation de la voie Shh est nécessaire et suffisante pour permettre l'accumulation du transcrit de *CDC25B*. Comme Shh est connu pour agir sur la prolifération cellulaire, il est possible que l'expression de *CDC25B* dépendante de Shh dans le tube neural soit une conséquence de l'action de la voie de signalisation sur la prolifération cellulaire. Plusieurs arguments vont à l'encontre de cette hypothèse: tout d'abord, l'expression d'autres régulateurs de la G2/M comme *CDC25A* ou *CDK1* ne sont pas modifiés dans des conditions de modulation de la voie de signalisation Shh, excluant la possibilité d'une variation générale de l'expression des régulateurs de la G2/M dans ce contexte. Ensuite, nous avons montré qu'au bout de 6 heures de traitement à la cyclopatamine l'expression de *CDC25B* est fortement diminuée. Dans ces conditions, malgré le fait que l'expression de *CDC25B* soit inhibée, l'analyse en cytométrie de flux ne montre pas de modification drastique du cycle cellulaire. En particulier, la proportion de cellules en phase G2+M dans l'échantillon traité est proche de celle dans l'échantillon témoin. Enfin, le blocage du cycle cellulaire sur 3 heures à l'aphidicoline ne conduit pas à une réduction de l'expression de *CDC25B* dans la plaque, la gouttière et le tube neural. L'ensemble de ces arguments nous conduit à proposer que l'expression de *CDC25B* dépendante de Shh ne soit pas la conséquence indirecte de l'action de cette voie de signalisation sur le cycle cellulaire mais que cette molécule soit une cible directe de cette voie.

Une étude du patron de *CDC25B* chez l'embryon de souris montre que l'expression de ce gène est régulée à la fois de façon développementale et de manière dépendante du cycle cellulaire (Kakizuka et al., 1992). A des stades plus tardifs du développement de la moelle épinière de poulet nous observons un patron d'expression de *CDC25B* suggestif d'une régulation dépendante du cycle cellulaire. L'expression de *CDC25B* dans la partie dorsale de la moelle épinière est alors plus importante du côté basal du neuroépithélium et contre la paroi du lumen. Ces domaines d'expression correspondent au positionnement des noyaux et de la majorité du cytoplasme des cellules en phase S et M durant la migration interkinétique (cf. Introduction, figure 4). L'expression de *CDC25B* dans la partie dorsale de la moelle épinière de souris à des stades tardifs ne semble pas être dépendante de Shh puisqu'elle est toujours présente dans les embryons Shh^{-/-} (données non montrées). L'accumulation des transcrits *CDC25B* dans les phases tardives de développement de la moelle épinière dorsale pourrait donc être dépendante d'une régulation *via* le cycle cellulaire alors qu'à des stades plus précoces une partie de l'expression de *CDC25B* est positivement régulée par la voie de

signalisation Shh. La régulation de *CDC25B* par Shh pourrait se faire directement par les facteurs de transcriptions Glis ou pourrait nécessiter d'autres intermédiaires. Le facteur de transcription FOXM1 est un bon candidat pour jouer le rôle d'intermédiaire dans la régulation de *CDC25B* par Shh. En effet, ce facteur de transcription est une cible de Gli1 dans les cellules de carcinome et il régule le niveau d'ARNm de *CDC25B* dans le foie de souris (Teh et al., 2002; Wang et al., 2002).

De manière intéressante, nous avons aussi observé que contrairement à d'autres régulateurs de la G2/M (*CDK1* et la *Cycline B2*), l'expression de *CDC25A* est régionalisée au cours des étapes précoces du développement de la moelle épinière chez le poulet. Dans un embryon au stade 10 HH, l'expression de *CDC25A* semble complémentaire de celle de *CDC25B*. *CDC25A* est exprimé dans la plaque et la gouttière neurale alors que l'expression de *CDC25B* apparaît dans le pré-tube neural. Dans le tube neural *CDC25A* est exprimé en gradient dorsoventral décroissant alors que *CDC25B* est exprimé dans un gradient inverse. Dans nos conditions expérimentales, l'expression de *CDC25A* n'est pas régulée par la voie de signalisation Shh. Le patron d'expression de *CDC25A* suggère que ce gène pourrait être régulé par d'autres voies de signalisation. Ainsi, la signalisation FGF qui assure le maintien des cellules de la plaque et la gouttière neurale dans un état immature pourrait réguler l'expression de *CDC25A* dans cette région. Par la suite, la signalisation Wnt β -caténine qui contrôle la prolifération des précurseurs neuronaux dans la partie dorsale du tube pourrait réguler le gradient dorsoventral décroissant de *CDC25A*.

Il est couramment admis que l'action des mitogènes se fait en début de cycle cellulaire favorisant le passage du point de restriction et permettant ainsi le déroulement du cycle jusqu'à la mitose. Pendant le développement, l'expression de *CDC25B* est régulée par la voie de signalisation Shh, l'expression de *CDC25A* semble être régulée par d'autres voies de signalisation. Il est donc possible qu'une partie de l'action mitogène de certaines voies de signalisation se fasse à une phase tardive du cycle cellulaire : ces voies de signalisation pourraient agir à la transition G2/M *via* la régulation de l'expression des phosphatases de type CDC25. L'étude que nous avons menée se porte sur l'analyse de la répartition des transcrits CDC25. L'analyse de la répartition des protéines CDC25 par immunodétection nous permettrait d'affiner notre connaissance des sites potentiels d'activité de ces protéines.

5/ La voie de signalisation Shh agit à la phase G1 et à la transition G2/M du cycle cellulaire.

Plusieurs études montrent que la voie de signalisation Shh peut avoir une action proliférative sur les cellules précurseurs du tube neural. D'une part, des expériences d'activation de la voie de manière ectopique dans la partie dorsale du tube neural de souris montrent qu'à des stades tardifs du développement Shh stimule la prolifération cellulaire et cause des phénotypes de surcroissance (Epstein et al., 1996; Rowitch et al., 1999). D'autre part, la présence de cyclopamine dans des cultures d'explant de moelle épinière inhibe la prolifération cellulaire (Agius et al., 2004). La voie de signalisation Shh régule positivement l'expression des *Cyclines D1* et *D2* pour médier son effet prolifératif sur les précurseurs des cellules granulaires du cervelet (Kenney et al., 2003; Kenney and Rowitch, 2000; Oliver et al., 2003). Ainsi, comme il est classiquement décrit pour les mitogènes, la voie de signalisation Shh agit sur l'expression des Cyclines D pour favoriser la prolifération cellulaire. Dans cette étude nous montrons que Shh régule l'expression de *Cycline D1* dans le tube neural. De plus, les expériences de gain de fonction montrent que la Cycline D1 est capable de stimuler la prolifération des précurseurs neuraux en bloquant leur différenciation. Cette action de la Cycline D1 passe probablement par une action positive sur la progression des cellules en phase G1 empêchant les cellules de sortir en phase G0 et de se différencier. Nous proposons donc que dans le tube neural l'action proliférative de Shh passe par un effet à la phase G1 du cycle cellulaire *via* l'action de la Cycline D1. L'analyse des paramètres du cycle cellulaire après inhibition de la voie Shh à la cyclopamine montre une augmentation de la proportion des cellules en phase G0/G1 et une réduction des cellules en phase S. Ces données suggèrent, qu'en absence de Shh, les précurseurs neuraux sont effectivement retardés dans leur progression au cours de la phase G1 du cycle cellulaire. Bien que l'ARNm Cycline D1 n'est presque plus détecté dans ces conditions, l'augmentation de la proportion de cellules en G1 est faible suggérant que certaines cellules pourraient continuer leur cycle cellulaire. Ce phénotype pourrait être expliquée par la stabilité de la protéine Cycline D1 au bout de 6 heures de traitement ou par la présence de protéine Cycline D2 qui pourraient contribuer au passage des cellules en phase S. Le sauvetage de cette accumulation de cellules en G1 par des expériences de gain de fonction avec la Cycline D1 permettrait de conclure quant à l'implication de cette molécule dans le contrôle du cycle cellulaire par Shh.

De manière intéressante des liens ont été établis entre la voie Shh et des régulateurs du cycle cellulaire agissant à la transition G2/M. En effet, des données obtenues en lignée cellulaire montrent que le récepteur à Shh, Ptc, interagit avec la Cycline B1 et peut ainsi réguler la progression dans le cycle cellulaire. En présence de ligand, la liaison entre Ptc et la Cycline B1 ne se fait plus, la Cycline B1 peut donc entrer dans le noyau ou elle va pouvoir permettre au complexe CDK1/ Cycline B1 de se former (Barnes et al., 2001). Il semble donc que la voie de signalisation Shh puisse agir sur la prolifération cellulaire au niveau de la phase G1 et au niveau de la transition G2/M. Dans cette étude nous montrons que l'inhibition de la voie Shh par des traitements à la cyclopamine entraîne une diminution du nombre de mitoses sans réduction de la proportion de cellules en phase G2 du cycle cellulaire. Cette inhibition pourrait être due au rôle de facteur de survie de Shh (Thibert et al., 2003). Cependant, nous observons une diminution des cellules en mitose même sur des embryons traités qui ne présentent pas de mort cellulaire anormalement élevée suggérant que l'effet observé sur les mitoses n'est pas la conséquence d'un phénomène d'apoptose (Emilie Peco, données non montrées). Ces données suggèrent donc que dans le tube neural l'action proliférative de Shh passe par un contrôle à la transition G2/M du cycle cellulaire. Cependant nous n'avons pas pu établir de corrélation stricte entre l'inhibition de l'expression de *CDC25B* et la diminution d'index mitotique observée. Cette donnée suggère que la régulation de *CDC25B* n'est pas suffisante à médier l'effet de Shh à la transition G2/M. Nous pouvons donc spéculer que l'action de la voie de signalisation Shh à la transition G2/M puisse être la conséquence de la somme de plusieurs mécanismes moléculaires. Tout d'abord la liaison de Shh à Ptc pourrait libérer la Cycline B et ainsi permettre la localisation nucléaire du complexe CDK1/Cycline B. De manière concomitante, l'induction de la phosphatase *CDC25B* par la voie de signalisation Shh pourrait participer à l'initiation du passage en mitose en activant les complexes CDK1/Cycline B. La cyclopamine inhibe la voie de transduction Shh au niveau de la protéine transmembranaire Smo qui exerce sa fonction en aval du récepteur Ptc. Il est donc possible que dans nos conditions de traitement à la cyclopamine, la protéine Shh participe toujours à la régulation de la transition G2/M en libérant la Cycline B de sa liaison à Ptc. L'utilisation d'un anticorps bloquant pour Shh permettrait d'analyser l'effet du blocage de la signalisation en amont du récepteur Ptc. Dans ce contexte, la libération de la Cycline B et l'activation de l'expression de *CDC25B* seraient inhibées ce qui pourrait nous permettre d'analyser l'ensemble de l'effet de Shh à la transition G2/M.

6/ Significations potentielles d'un contrôle à la transition G2/M dans les cellules précurseurs du tube neural.

A des stades jeunes de développement la densité mitotique est plus importante dans la partie ventrale du tube neural. Cette densité mitotique élevée est corrélée avec une forte expression de la phosphatase CDC25B. Des analyses fonctionnelles dans divers systèmes montrent que CDC25B régule la transition G2/M. Chez la drosophile, la perte de fonction de l'orthologue de *CDC25B*, *String*, provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Edgar and O'Farrell, 1989). Des données montrent qu'en lignée cellulaire humaine la perte de fonction de CDC25B entraîne aussi un arrêt des cellules en phase G2 et que l'expression forcée de CDC25B provoque une entrée prématurée des cellules en mitoses (Karlsson et al., 1999; Lammer et al., 1998). Chez la souris, la perte de fonction du gène *CDC25B* conduit à une stérilité chez la femelle provoquée par l'absence de maturation ovocytaire mais n'entraîne pas d'autres phénotypes évidents (Lincoln et al., 2002). L'absence de phénotype neural dans les embryons de souris *CDC25B*^{-/-} pourrait être expliquée par une compensation fonctionnelle des autres gènes de la famille CDC25: *CDC25A* et *CDC25C*. Une étude récente montre que les souris doubles mutantes pour les gènes *CDC25B* et *CDC25C* ne présentent pas de phénotypes plus importants que les souris mutantes pour le gène *CDC25B* suggérant que *CDC25A* ou d'autres phosphatases pourraient compenser la perte de fonction de *CDC25B* et *CDC25C* (Ferguson et al., 2005). L'implication de la fonction de *CDC25B* dans le contrôle de la transition G2/M des précurseurs neuraux reste donc à déterminer. Des analyses préliminaires de gain de fonction menées au laboratoire montrent que la surexpression de la phosphatase CDC25B humaine augmente l'index mitotique dans le tube neural suggérant que CDC25B est suffisant pour provoquer une entrée des cellules en mitose comme dans les cellules humaines (Emilie Peco, résultats non publiés). Ces résultats restent à confirmer avec la protéine CDC25B de poulet. La faible conservation entre la protéine de poulet et la protéine humaine laisse suggérer que ces phosphatases pourraient avoir des fonctions différentes. Nous pouvons toutefois émettre l'hypothèse que la fonction de CDC25B, comme celle de la Cycline D1, pourrait être de maintenir les précurseurs neuraux en prolifération en agissant à la transition G2/M. L'activation de CDC25B permettrait ainsi de maintenir un fort taux de précurseurs dans le cycle dans la partie ventrale du tube neural (Figure 23 A).

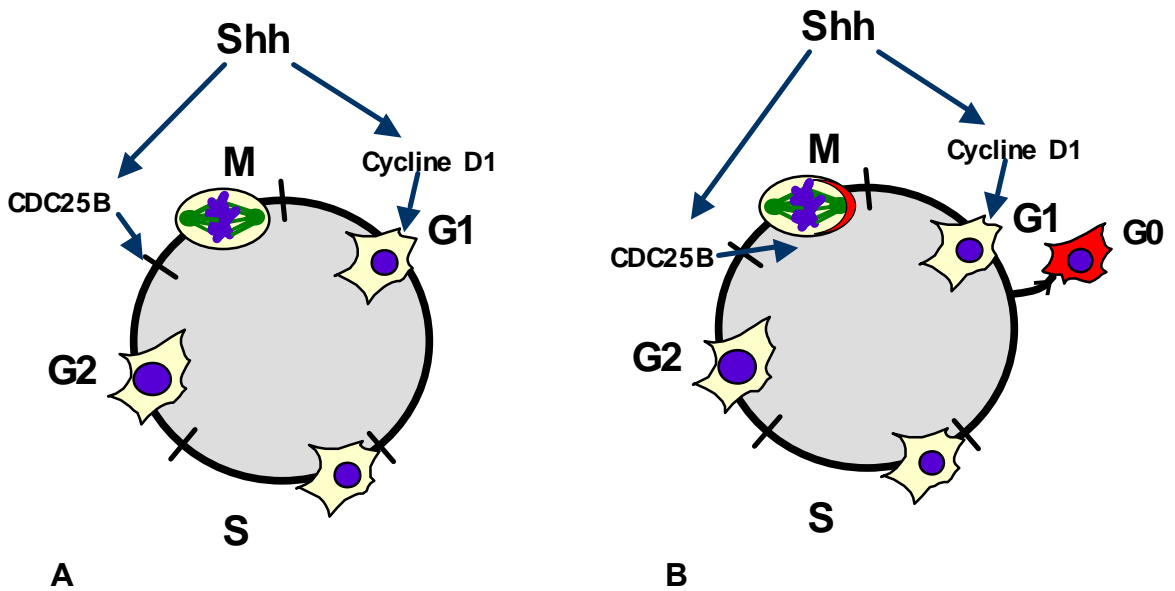


Figure 23 : Modèles de l'action de Shh à la phase G1 et à la transition G2/M sur le destin des cellules précurseurs neuraux .

A) Shh maintient les précurseurs neuraux en prolifération en activant la Cycline D1 qui va favoriser la progression des cellules en G1 et CDC25B qui va permettre la transition G2/M. B) Shh permet une prolifération neurogène. La Cycline D1 va favoriser la progression des cellules en G1. L'activation de CDC25B va contribuer à la maintenance d'un déterminant de manière asymétrique lors de la mitose des précurseurs neuraux. La ségrégation différentielle de ce déterminant va permettre à une cellule fille de rester dans le cycle cellulaire alors que l'autre se différencie.

De manière intéressante la voie de signalisation Shh qui contrôle la prolifération des précurseurs neuraux a aussi été impliquée dans les mécanismes de neurogenèse. Ainsi, chez le Xénope la surexpression de Gli1 est capable d'induire l'induction de neurones en position ectopique alors que les pertes de fonction de Gli1, Gli2 ou Gli3 inhibent les mécanismes de neurogenèse primaire (Brewster et al., 1998; Nguyen et al., 2005). De plus, des travaux suggèrent que la différenciation des motoneurones est dépendante de la signalisation Shh jusqu'à une phase tardive du dernier cycle cellulaire des précurseurs neuraux (Ericson et al., 1996).

La mitose est une phase cruciale lors du processus de division asymétrique. La division asymétrique est un mécanisme général qui va créer de la diversité cellulaire lors du développement embryonnaire. La ségrégation différentielle de déterminants dans une ou l'autre des cellules filles au cours de la mitose va engager ces cellules dans des destins différents. Les mécanismes moléculaires de la division asymétrique ont été très étudiés lors du processus de neurogenèse chez la drosophile. Ainsi, la distribution asymétrique de la protéine Numb lors de la division des précurseurs des organes sensoriels oriente les deux cellules filles vers des destins différents (Rhyu et al., 1994). Dans ce modèle, il a été montré qu'une interaction existe entre la machinerie du cycle cellulaire et celle de la division asymétrique (pour revue voir (Prokopenko and Chia, 2005)). Par exemple, la maintenance asymétrique de déterminants du coté apical des précurseurs neuraux nécessite une forte activité du complexe CDK1/Cycline B (Tio et al., 2001). De manière intéressante, plusieurs données montrent que les mécanismes de division asymétriques sont mis en jeu lors des processus de neurogenèse chez les Vertébrés (pour revue voir (Betschinger and Knoblich, 2004)). Ainsi, les orthologues du déterminant Numb ont été identifiés chez le poulet et la souris. Chez le poulet la protéine Numb est localisée asymétriquement dans la partie basale des précurseurs neuraux en division (Wakamatsu et al., 1999). Chez la souris, la perte de fonction des gènes Numb et Numb like montre que ces deux gènes sont requis pour maintenir un pool de précurseurs neuraux en prolifération au niveau de la moelle épinière (Petersen et al., 2004).

Nous avons observé que l'initiation de CDC25B précède l'apparition de la différenciation dans le tube neural. De plus, l'expression de CDC25B dans la partie ventrale du tube neural est corrélée avec la phase de production des motoneurones. Dans ce contexte, il est possible de spéculer que l'activation de la phosphatase CDC25B pourrait effectuer un lien entre la voie de signalisation Shh et les processus de neurogenèse. L'activation du complexe CDK1/Cycline B par la phosphatase CDC25B pourrait permettre la maintenance

d'un déterminant de manière asymétrique lors de la mitose des précurseurs neuraux. La ségrégation différentielle de ce déterminant permettrait ainsi à une cellule fille de rester dans le cycle cellulaire alors que l'autre se différencie (Figure 23B). L'activation de CDC25B permettrait alors une prolifération neurogène permettant la production importante de motoneurones dans la partie ventrale du tube neural.

7/ Modèle du rôle de la prolifération dépendante de Shh dans la régionalisation tissulaire.

Cette étude montre que la voie de signalisation Shh régule positivement l'expression de deux régulateurs du cycle cellulaire dans la partie ventrale du tube neural : la Cycline D1 et CDC25B. L'action de Shh sur la prolifération des précurseurs neuraux ventraux semble pourtant être limitée. En effet, la perte de fonction de la voie de signalisation Shh par des traitements à la cyclopamine n'a que peu d'effet sur le cycle cellulaire en comparaison avec des traitements à l'aphidicoline. Bien que ces effets limités puissent être expliqués par des durées de traitements trop courtes, ces résultats suggèrent aussi que la prolifération des cellules du tube neural pourrait avoir lieu en absence de cette voie de signalisation. Quel pourrait donc être le rôle de cette implication partielle dans le contrôle de la prolifération du tube neural ?

Shh agit comme un morphogène dans le tube neural. Ainsi il est proposé qu'un gradient de cette protéine entraîne un gradient d'activité de protéines Glis, qui à son tour régule une combinatoire d'expression de facteurs de transcription à homéodomaines contrôlant la genèse des différents sous types neuronaux ventraux (cf. introduction). Plusieurs études récentes montrent qu'en plus de la concentration de protéine, la durée d'exposition à Shh va être fondamentale dans la lecture du signal nécessaire à l'effet produit par le morphogène (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004; Stamatakis et al., 2005; Zeller, 2004). Plus les cellules sont exposées au signal plus leur réponse à ce signal va être augmentée ; dans le cas du tube neural une longue durée d'exposition à Shh va mener à l'induction de marqueurs caractéristiques de la région la plus ventrale. Dans ce modèle il est suggéré que l'induction des marqueurs les plus ventraux va donc nécessiter l'exposition à de fortes doses de Shh sur une longue durée alors que l'induction de marqueurs moins ventraux va nécessiter de plus faibles doses de Shh et/ou des durées d'exposition plus courtes (Stamatakis et al., 2005). Le contrôle de la prolifération de la partie ventrale du tube neural pourrait aussi intervenir dans la mise en place du gradient de morphogène Shh. En effet, la prolifération de la partie la plus ventrale du tube neural peut permettre sa croissance selon l'axe ventro dorsal et ainsi contribuer au contrôle de la distance entre les différentes populations de précurseurs neuraux et la source de Shh.

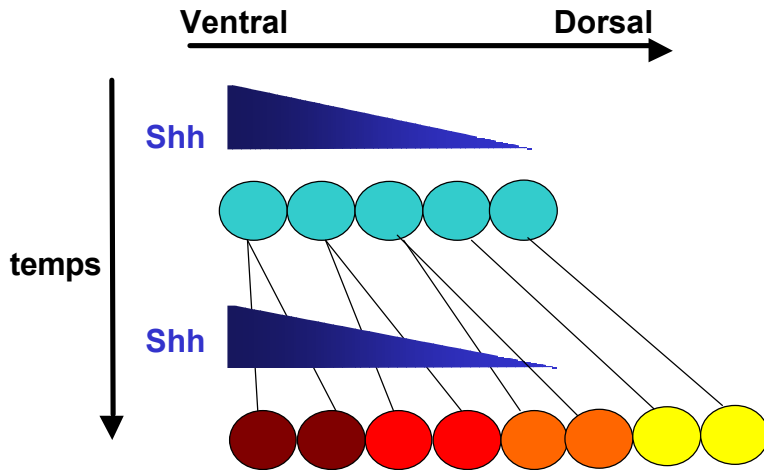


Figure 24 : Modèle d'intégration de la prolifération dans l'effet morphogène de Shh.

Les cellules les plus ventrales vont se diviser plus activement que les cellules les plus dorsales (suivre les traits pour voir le liens entre cellules mères et cellules filles). Les cellules situées plus ventralement qui vont recevoir une forte dose de morphogène plus longtemps vont adopter le destin le plus ventral (couleur bordeaux), en comparaison les cellules repoussées dorsalement par la croissance ventrale auront reçu moins de morphogène par une durée plus courte et vont adopter un destin de plus en plus dorsal (rouge orange et jaune). Ainsi les cellules qui vont adopter le destin le plus dorsal (jaune) ont reçu une faible dose de morphogène au début du développement avant d'être éloignées de la source de morphogène par la croissance ventrale, elles auront donc reçu peu de morphogène pendant un temps court.

Les cellules les plus ventrales du tube neural vont recevoir beaucoup de signal Shh ce qui va entraîner une augmentation de leur prolifération, cette augmentation de prolifération va permettre une croissance accrue de la structure. Les cellules qui restent proches de la source (haute dose de Shh, pour une longue durée) vont adopter un destin ventral alors que les cellules qui se trouvent repoussées à distance de la source lors de cette croissance vont être exposées à de faibles doses de Shh pendant des durées d'exposition réduites et vont donc adopter un destin plus dorsal (figure 24). La signalisation Shh pourrait ainsi provoquer une augmentation de la prolifération (par l'intermédiaire de la régulation de *Cycline D1* et *CDC25B*) nécessaire à la régionalisation de la partie ventrale tube neural. De manière intéressante des travaux récents suggèrent que pendant le développement du bourgeon de membre un gradient temporel de Shh établi par les dérivés de la ZPA joue un rôle crucial dans la spécification de l'identité des doigts selon l'axe antéropostérieur (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004; Zeller, 2004) (figure 14C). Dans le bourgeon de membre, *CDC25B* est exprimé en gradient postero-antérieur décroissant et est régulé par Shh suggérant que dans ce site embryonnaire Shh régule la prolifération cellulaire. En influençant la prolifération des cellules précurseurs dérivées de la ZPA, Shh contribuerait à la régulation de la durée d'exposition et de la dose de morphogène reçue par les cellules. Le contrôle de la prolifération par Shh pourrait donc influencer la mise en place des différents destins cellulaires le long de l'axe antéropostérieur du bourgeon de membre. Ce modèle d'intégration et de l'influence du contrôle de la prolifération par Shh lors de son action sur la régionalisation d'un tissu serait donc un phénomène conservé dans les différents sites embryonnaires où Shh a une action morphogène. L'identification des mécanismes moléculaires et l'analyse dynamique du comportement des cellules en terme de prolifération lors de la régionalisation d'un tissu permettrait d'élargir notre compréhension des dispositifs d'action d'un morphogène.

CONCLUSION

L'objectif de ces travaux a été de mieux comprendre comment le contrôle de la prolifération cellulaire est coordonné aux mécanismes de développement de l'ébauche de moelle épinière. La voie de signalisation Shh contrôle à la fois la spécification et la prolifération cellulaire dans la partie ventrale du tube neural. Dans ce cadre nous avons tenté d'identifier les mécanismes moléculaires de l'action de cette voie sur le contrôle de la prolifération des cellules précurseurs du tube neural.

L'analyse de l'expression de différents régulateurs du cycle cellulaire dans l'ébauche de moelle épinière nous a permis d'identifier deux d'entre eux comme étant des cibles potentielles de la voie de signalisation Shh. En effet, *Cycline D1* et *CDC25B* sont exprimés dans la partie ventrale de la gouttière neurale, zone d'influence de la signalisation Shh. Des analyses de gain et de perte de fonction nous ont permis de montrer que la signalisation Shh régule positivement l'expression de ces deux gènes dans l'ébauche de moelle épinière. Ces résultats montrent donc que dans le tube neural la signalisation Shh régule positivement l'expression de deux régulateurs du cycle cellulaire agissant à deux périodes distinctes du cycle : la *Cycline D1* favorisant la progression en phase G1 et *CDC25B* contrôlant la transition G2/M.

L'analyse de l'inhibition de la voie Shh dans le tube neural suggère que cette voie de signalisation favorise la progression des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Les expériences de sur expression montrent que la Cycline D1 est capable de stimuler la prolifération des précurseurs neuraux au détriment de leur différenciation. Cette Cycline pourrait donc permettre la progression des précurseurs en phase G1 et empêcher leur sortie en G0. Nous proposons donc que dans le tube neural l'action proliférative de Shh passe par un effet à la phase G1 du cycle cellulaire *via* l'action de la Cycline D1.

En plus de son rôle en phase G1, l'action de la voie de signalisation Shh sur la prolifération semble aussi passer par un contrôle positif à la transition G2/M. Le rôle de la régulation positive de la phosphatase CDC25B par Shh dans le contrôle en G2/M reste à préciser. L'influence du lien entre Shh et CDC25B sur le destin des précurseurs neuraux reste aussi à déterminer. Des expériences de gain et de perte de fonction de CDC25B dans le tube neural permettront sûrement de préciser le rôle de cette phosphatase dans ce contexte développemental.

Cette étude nous permet de mieux comprendre par quels mécanismes la voie de signalisation Shh va coordonner la prolifération avec la régionalisation du tube neural. La compréhension de ces mécanismes contribue à savoir comment se fait la coordination des processus de prolifération, de spécification et de différenciation qui va permettre la mise en

CONCLUSION

place des différents sous types neuronaux à des positions définies et en nombre approprié au sein de la moelle épinière.

BIBLIOGRAPHIE

- Agius, E., Soukkaie, C., Danesin, C., Kan, P., Takebayashi, H., Soula, C., and Cochard, P. (2004). Converse control of oligodendrocyte and astrocyte lineage development by Sonic hedgehog in the chick spinal cord. *Dev Biol* **270**, 308-21.
- Ahn, S., and Joyner, A. L. (2004). Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* **118**, 505-16.
- Aza-Blanc, P., Lin, H. Y., Ruiz i Altaba, A., and Kornberg, T. B. (2000). Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* **127**, 4293-301.
- Bai, C. B., Auerbach, W., Lee, J. S., Stephen, D., and Joyner, A. L. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* **129**, 4753-61.
- Bai, C. B., and Joyner, A. L. (2001). Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development* **128**, 5161-72.
- Bai, C. B., Stephen, D., and Joyner, A. L. (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell* **6**, 103-15.
- Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., and Donoghue, D. J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *Embo J* **20**, 2214-23.
- Bertrand, N., Castro, D. S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-30.
- Bertrand, N., Medevielle, F., and Pituello, F. (2000). FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development* **127**, 4837-43.
- Betschinger, J., and Knoblich, J. A. (2004). Dare to be different: asymmetric cell division in Drosophila, C. elegans and vertebrates. *Curr Biol* **14**, R674-85.
- Bottcher, R. T., and Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* **26**, 63-77.
- Brewster, R., Lee, J., and Ruiz i Altaba, A. (1998). Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* **393**, 579-83.
- Brewster, R., Mullor, J. L., and Ruiz i Altaba, A. (2000). Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development* **127**, 4395-405.

- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M., and 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**, 1279-91.
- Briscoe, J., and Ericson, J. (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 43-9.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-45.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L., and Ericson, J. (1999). Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398**, 622-7.
- Britto, J., Tannahill, D., and Keynes, R. (2002). A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain. *Nat Neurosci* **5**, 103-10.
- Brown, J. M., and Storey, K. G. (2000). A region of the vertebrate neural plate in which neighbouring cells can adopt neural or epidermal fates. *Curr Biol* **10**, 869-72.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* **202**, 59-68.
- Carruthers, S., Mason, J., and Papalopulu, N. (2003). Depletion of the cell-cycle inhibitor p27(Xic1) impairs neuronal differentiation and increases the number of ElrC(+) progenitor cells in *Xenopus tropicalis*. *Mech Dev* **120**, 607-16.
- Carthon, B. C., Neumann, C. A., Das, M., Pawlyk, B., Li, T., Geng, Y., and Sicinski, P. (2005). Genetic replacement of cyclin D1 function in mouse development by cyclin D2. *Mol Cell Biol* **25**, 1081-8.
- Catala, M., Teillet, M. A., De Robertis, E. M., and Le Douarin, M. L. (1996). A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* **122**, 2599-610.
- Cauthen, C. A., Berdougo, E., Sandler, J., and Burrus, L. W. (2001). Comparative analysis of the expression patterns of Wnts and Frizzleds during early myogenesis in chick embryos. *Mech Dev* **104**, 133-8.
- Chamoun, Z., Mann, R. K., Nellen, D., von Kessler, D. P., Bellotto, M., Beachy, P. A., and Basler, K. (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* **293**, 2080-4.

- Charrier, J. B., Lapointe, F., Le Douarin, N. M., and Teillet, M. A. (2002). Dual origin of the floor plate in the avian embryo. *Development* **129**, 4785-96.
- Chesnutt, C., Burrus, L. W., Brown, A. M., and Niswander, L. (2004). Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGFbeta and WNT activity. *Dev Biol* **274**, 334-47.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Ciemerych, M. A., Kenney, A. M., Sicinska, E., Kalaszczynska, I., Bronson, R. T., Rowitch, D. H., Gardner, H., and Sicinski, P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* **16**, 3277-89.
- Colas, J. F., and Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* **221**, 117-45.
- Coleman, M. L., Marshall, C. J., and Olson, M. F. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 355-66.
- Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* **299**, 35-55.
- Corliss, C. E., and Robertson, G. G. (1963). The Pattern of Mitotic Density in the Early Chick Neural Epithelium. *J Exp Zool* **153**, 125-40.
- Crossley, P. H., and Martin, G. R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**, 439-51.
- Dahmane, N., and Ruiz i Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* **126**, 3089-100.
- Dahmane, N., Sanchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H., and Ruiz i Altaba, A. (2001). The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* **128**, 5201-12.
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M., and Ishii, S. (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem* **274**, 8143-52.
- del Corral, R. D., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., and Storey, K. (2003). Opposing FGF and Retinoid Pathways Control Ventral Neural Pattern, Neuronal Differentiation, and Segmentation during Body Axis Extension. *Neuron* **40**, 65-79.

- Diez del Corral, R., Breitkreuz, D. N., and Storey, K. G. (2002). Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signalling. *Development* **129**, 1681-91.
- Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., and Storey, K. (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* **40**, 65-79.
- Diez del Corral, R., and Storey, K. G. (2001). Markers in vertebrate neurogenesis. *Nat Rev Neurosci* **2**, 835-9.
- Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J., and Hui, C. C. (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* **125**, 2533-43.
- Dono, R. (2003). Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**, R867-81.
- Doree, M., and Hunt, T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* **115**, 2461-4.
- Dubrulle, J., and Pourquie, O. (2004). fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* **427**, 419-22.
- Duman-Scheel, M., Weng, L., Xin, S., and Du, W. (2002). Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* **417**, 299-304.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417-30.
- Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H. (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 177-87.
- Epstein, D. J., Marti, E., Scott, M. P., and McMahon, A. P. (1996). Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway. *Development* **122**, 2885-94.
- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., and Jessell, T. M. (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**, 451-66.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661-73.

- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M., and Yamada, T. (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* **256**, 1555-60.
- Fan, H., and Khavari, P. A. (1999). Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *J Cell Biol* **147**, 71-6.
- Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I., and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* **9**, 2364-72.
- Ferguson, A. M., White, L. S., Donovan, P. J., and Piwnicka-Worms, H. (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol Cell Biol* **25**, 2853-60.
- Franz, T. (1994). Extra-toes (Xt) homozygous mutant mice demonstrate a role for the *Gli-3* gene in the development of the forebrain. *Acta Anat (Basel)* **150**, 38-44.
- Goodrich, L. V., Milenkovic, L., Higgins, K. M., and Scott, M. P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**, 1109-13.
- Granata, A., and Quaderi, N. A. (2005). Asymmetric expression of *Gli* transcription factors in Hensen's node. *Gene Expr Patterns* **5**, 529-31.
- Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* **195**, 231-72.
- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P., and Tabin, C. J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal *Shh* gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517-28.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., and Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a *Delta* homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787-90.
- Henrique, D., Tyler, D., Kintner, C., Heath, J. K., Lewis, J. H., Ish-Horowicz, D., and Storey, K. G. (1997). *cash4*, a novel achaete-scute homolog induced by Hensen's node during generation of the posterior nervous system. *Genes Dev* **11**, 603-15.
- Ho, A., and Dowdy, S. F. (2002). Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 47-52.
- Hollyday, M. (2001). Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *Int J Dev Neurosci* **19**, 161-73.
- Hooper, J. E., and Scott, M. P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 306-17.

- Huard, J. M., Forster, C. C., Carter, M. L., Sicinski, P., and Ross, M. E. (1999). Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development* **126**, 1927-35.
- Hynes, M., Stone, D. M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A., and Rosenthal, A. (1997). Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* **19**, 15-26.
- Hynes, M., Ye, W., Wang, K., Stone, D., Murone, M., Sauvage, F., and Rosenthal, A. (2000). The seven-transmembrane receptor smoothed cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat Neurosci* **3**, 41-6.
- Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P., and Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* **125**, 3553-62.
- Ishibashi, M., and McMahon, A. P. (2002). A sonic hedgehog-dependent signaling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo. *Development* **129**, 4807-19.
- Jacob, J., and Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* **4**, 761-5.
- Jeong, J., and McMahon, A. P. (2005). Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* **132**, 143-54.
- Kakizuka, A., Sebastian, B., Borgmeyer, U., Hermans-Borgmeyer, I., Bolado, J., Hunter, T., Hoekstra, M. F., and Evans, R. M. (1992). A mouse cdc25 homolog is differentially and developmentally expressed. *Genes Dev* **6**, 578-90.
- Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I., and Pines, J. (1999). Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *J Cell Biol* **146**, 573-84.
- Kenney, A. M., Cole, M. D., and Rowitch, D. H. (2003). Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* **130**, 15-28.
- Kenney, A. M., and Rowitch, D. H. (2000). Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol* **20**, 9055-67.
- Kowalczyk, A., Filipkowski, R. K., Rylski, M., Wilczynski, G. M., Konopacki, F. A., Jaworski, J., Ciemerych, M. A., Sicinski, P., and Kaczmarek, L. (2004). The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis. *J Cell Biol* **167**, 209-13.

- Kozar, K., Ciemerych, M. A., Rebel, V. I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R. T., Akashi, K., and Sicinski, P. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of d-cyclins. *Cell* **118**, 477-91.
- Kristjansdottir, K., and Rudolph, J. (2004). Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol* **11**, 1043-51.
- Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H., and Schaffer, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* **6**, 21-7.
- Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W., and Hoffmann, I. (1998). The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* **111 (Pt 16)**, 2445-53.
- Langman, J., Guerrant, R. L., and Freeman, B. G. (1966). Behavior of neuro-epithelial cells during closure of the neural tube. *J Comp Neurol* **127**, 399-411.
- Le Douarin, N. M., and Halpern, M. E. (2000). Discussion point. Origin and specification of the neural tube floor plate: insights from the chick and zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 23-30.
- Le Douarin, N. M., Teillet, M. A., and Catala, M. (1998). Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int J Dev Biol* **42**, 909-16.
- Lee, J., Platt, K. A., Censullo, P., and Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* **124**, 2537-52.
- Lee, K. J., Dietrich, P., and Jessell, T. M. (2000). Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* **403**, 734-40.
- Lee, S. K., Lee, B., Ruiz, E. C., and Pfaff, S. L. (2005). Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes Dev* **19**, 282-94.
- Lee, S. K., and Pfaff, S. L. (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1183-91.
- Lei, Q., Zelman, A. K., Kuang, E., Li, S., and Matise, M. P. (2004). Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development* **131**, 3593-604.
- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**, 803-14.
- Lewis, P. M., Dunn, M. P., McMahan, J. A., Logan, M., Martin, J. F., St-Jacques, B., and McMahan, A. P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for

- long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* **105**, 599-612.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., and Jessell, T. M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91**, 127-38.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-79.
- Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P., Tessarollo, L., and Donovan, P. J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet* **30**, 446-9.
- Litingtung, Y., and Chiang, C. (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* **3**, 979-85.
- Logan, M. (2003). Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development* **130**, 6401-10.
- Ma, Q., Kintner, C., and Anderson, D. J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* **87**, 43-52.
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritli-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L., Dudek, H., McMahon, A. P., and Fishell, G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**, 937-50.
- Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* **3**, 843-53.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493-504.
- Marigo, V., Johnson, R. L., Vortkamp, A., and Tabin, C. J. (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* **180**, 273-83.
- Marigo, V., and Tabin, C. J. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9346-51.
- Marti, E., Bumcrot, D. A., Takada, R., and McMahon, A. P. (1995a). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* **375**, 322-5.

- Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D. A., Sasaki, H., and McMahon, A. P. (1995b). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* **121**, 2537-47.
- Mathis, L., Kulesa, P. M., and Fraser, S. E. (2001). FGF receptor signalling is required to maintain neural progenitors during Hensen's node progression. *Nat Cell Biol* **3**, 559-66.
- Matise, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A., and Joyner, A. L. (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* **125**, 2759-70.
- McConnell, J. A., and Sechrist, J. W. (1980). Identification of early neurons in the brainstem and spinal cord: I. An autoradiographic study in the chick. *J Comp Neurol* **192**, 769-83.
- McMahon, A. P., Ingham, P. W., and Tabin, C. J. (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* **53**, 1-114.
- Megason, S. G., and McMahon, A. P. (2002). A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* **129**, 2087-98.
- Meyers, E. N., Lewandoski, M., and Martin, G. R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* **18**, 136-41.
- Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K., and Nakafuku, M. (2001). Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**, 757-71.
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H., and Takada, S. (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev* **16**, 548-53.
- Nguyen, V., Chokas, A. L., Stecca, B., and Altaba, A. R. (2005). Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis. *Development* **132**, 3267-79.
- Novitch, B. G., Chen, A. I., and Jessell, T. M. (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* **31**, 773-89.
- Novitch, 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.

- Odenthal, J., van Eeden, F. J., Haffter, P., Ingham, P. W., and Nusslein-Volhard, C. (2000). Two distinct cell populations in the floor plate of the zebrafish are induced by different pathways. *Dev Biol* **219**, 350-63.
- Ohnuma, S., and Harris, W. A. (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* **40**, 199-208.
- Oliver, T. G., Grasfeder, L. L., Carroll, A. L., Kaiser, C., Gillingham, C. L., Lin, S. M., Wickramasinghe, R., Scott, M. P., and Wechsler-Reya, R. J. (2003). Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7331-6.
- Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335-44.
- Palma, V., and Ruiz i Altaba, A. (2004). Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* **131**, 337-45.
- Panman, L., and Zeller, R. (2003). Patterning the limb before and after SHH signalling. *J Anat* **202**, 3-12.
- Park, H. L., Bai, C., Platt, K. A., Matise, M. P., Beeghly, A., Hui, C. C., Nakashima, M., and Joyner, A. L. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* **127**, 1593-605.
- Persson, M., Stamatakis, D., te Welscher, P., Andersson, E., Bose, J., Ruther, U., Ericson, J., and Briscoe, J. (2002). Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes Dev* **16**, 2865-78.
- Petersen, P. H., Zou, K., Krauss, S., and Zhong, W. (2004). Continuing role for mouse Numb and Numbl in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis. *Nat Neurosci* **7**, 803-11.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T. M. (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* **97**, 903-15.
- Pituello, F., Medevielle, F., Foulquier, F., and Duprat, A. M. (1999). Activation of Pax6 depends on somitogenesis in the chick embryo cervical spinal cord. *Development* **126**, 587-96.
- Placzek, M., Dodd, J., and Jessell, T. M. (2000). Discussion point. The case for floor plate induction by the notochord. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 15-22.
- Placzek, M., Jessell, T. M., and Dodd, J. (1993). Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development* **117**, 205-18.

- Prokopenko, S. N., and Chia, W. (2005). When timing is everything: role of cell cycle regulation in asymmetric division. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 423-37.
- Raya, A., and Belmonte, J. C. (2004). Sequential transfer of left-right information during vertebrate embryo development. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 575-81.
- Rhyu, M. S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* **76**, 477-91.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-16.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., and et al. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* **76**, 761-75.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., and Jessell, T. M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-55.
- Rowitch, D. H., B, S. J., Lee, S. M., Flax, J. D., Snyder, E. Y., and McMahon, A. P. (1999). Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci* **19**, 8954-65.
- Roztocil, T., Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Ballivet, M., and Matter, J. M. (1997). NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. *Development* **124**, 3263-72.
- Ruiz i Altaba, A. (1997). Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell* **90**, 193-6.
- Ruiz i Altaba, A. (1998). Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* **125**, 2203-12.
- Ruiz i Altaba, A. (1999). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* **126**, 3205-16.
- Ruiz i Altaba, A., Jessell, T. M., and Roelink, H. (1995). Restrictions to floor plate induction by hedgehog and winged-helix genes in the neural tube of frog embryos. *Mol Cell Neurosci* **6**, 106-21.
- Ruiz i Altaba, A., Nguyen, V., and Palma, V. (2003). The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 513-21.

- Ruiz i Altaba, A., Stecca, B., and Sanchez, P. (2004). Hedgehog-Gli signaling in brain tumors: stem cells and paradevelopmental programs in cancer. *Cancer Lett* **204**, 145-57.
- Ruiz i Altaba A., Palma, V., and Dahmane, N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* **3**, 24-33.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., and Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* **126**, 3915-24.
- Scardigli, R., Schuurmans, C., Gradwohl, G., and Guillemot, F. (2001). Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord. *Neuron* **31**, 203-17.
- Schauerte, H. E., van Eeden, F. J., Fricke, C., Odenthal, J., Strahle, U., and Haftter, P. (1998). Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish. *Development* **125**, 2983-93.
- Sechrist, J., and Bronner-Fraser, M. (1991). Birth and differentiation of reticular neurons in the chick hindbrain: ontogeny of the first neuronal population. *Neuron* **7**, 947-63.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12.
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Parker, S. B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S. Z., Bronson, R. T., Elledge, S. J., and Weinberg, R. A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* **82**, 621-30.
- Smith, J. L., and Schoenwolf, G. C. (1987). Cell cycle and neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate. *Anat Rec* **218**, 196-206.
- Smits, V. A., and Medema, R. H. (2001). Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta* **1519**, 1-12.
- Spann, P., Ginsburg, M., Rangini, Z., Fainsod, A., Eyal-Giladi, H., and Gruenbaum, Y. (1994). The spatial and temporal dynamics of Sax1 (CHox3) homeobox gene expression in the chick's spinal cord. *Development* **120**, 1817-28.
- Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S. V., Mynett, A., and Briscoe, J. (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* **19**, 626-41.
- Storey, K. G., Goriely, A., Sargent, C. M., Brown, J. M., Burns, H. D., Abud, H. M., and Heath, J. K. (1998). Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. *Development* **125**, 473-84.

- Tanabe, Y., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1995). Induction of motor neurons by Sonic hedgehog is independent of floor plate differentiation. *Curr Biol* **5**, 651-8.
- Taupin, P., and Gage, F. H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* **69**, 745-9.
- Teh, M. T., Wong, S. T., Neill, G. W., Ghali, L. R., Philpott, M. P., and Quinn, A. G. (2002). FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res* **62**, 4773-80.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-6.
- Theil, T., Alvarez-Bolado, G., Walter, A., and Ruther, U. (1999). Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* **126**, 3561-71.
- Thibert, C., Teillet, M. A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N. M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* **301**, 843-6.
- Tickle, C. (2004). The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mech Dev* **121**, 1019-29.
- Timmer, J. R., Wang, C., and Niswander, L. (2002). BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development* **129**, 2459-72.
- Tio, M., Udolph, G., Yang, X., and Chia, W. (2001). cdc2 links the Drosophila cell cycle and asymmetric division machineries. *Nature* **409**, 1063-7.
- Vaccarino, F. M., Schwartz, M. L., Raballo, R., Nilsen, J., Rhee, J., Zhou, M., Doetschman, T., Coffin, J. D., Wyland, J. J., and Hung, Y. T. (1999). Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci* **2**, 246-53.
- van Straaten, H. W., Hekking, J. W., Thors, F., Wiertz-Hoessels, E. L., and Drukker, J. (1985). Induction of an additional floor plate in the neural tube. *Acta Morphol Neerl Scand* **23**, 91-7.
- van Straaten, H. W., Hekking, J. W., Wiertz-Hoessels, E. J., Thors, F., and Drukker, J. (1988). Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* **177**, 317-24.
- Vernon, A. E., Devine, C., and Philpott, A. (2003). The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in Xenopus. *Development* **130**, 85-92.

- Wakamatsu, Y., Maynard, T. M., Jones, S. U., and Weston, J. A. (1999). NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron* **23**, 71-81.
- Wallace, V. A. (1999). Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* **9**, 445-8.
- Wang, B., Fallon, J. F., and Beachy, P. A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**, 423-34.
- Wang, X., Krupczak-Hollis, K., Tan, Y., Dennewitz, M. B., Adami, G. R., and Costa, R. H. (2002). Increased hepatic Forkhead Box M1B (FoxM1B) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27Kip1 protein levels and increased Cdc25B expression. *J Biol Chem* **277**, 44310-6.
- Wechsler-Reya, R. J., and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* **22**, 103-14.
- Wianny, F., Real, F. X., Mummery, C. L., Van Rooijen, M., Lahti, J., Samarut, J., and Savatier, P. (1998). G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev Dyn* **212**, 49-62.
- Wijgerde, M., McMahon, J. A., Rule, M., and McMahon, A. P. (2002). A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes Dev* **16**, 2849-64.
- Wilson, L., Gale, E., Chambers, D., and Maden, M. (2004). Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Dev Biol* **269**, 433-46.
- Wilson, L., and Maden, M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* **282**, 1-13.
- Wine-Lee, L., Ahn, K. J., Richardson, R. D., Mishina, Y., Lyons, K. M., and Crenshaw, E. B., 3rd. (2004). Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development* **131**, 5393-403.
- Xu, J., Liu, Z., and Ornitz, D. M. (2000). Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* **127**, 1833-43.
- Yaginuma, H., Shiga, T., Homma, S., Ishihara, R., and Oppenheim, R. W. (1990). Identification of early developing axon projections from spinal interneurons in the

- chick embryo with a neuron specific beta-tubulin antibody: evidence for a new 'pioneer' pathway in the spinal cord. *Development* **108**, 705-16.
- Yamada, T., Pfaff, S. L., Edlund, T., and Jessell, T. M. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* **73**, 673-86.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* **64**, 635-47.
- Yoon, J. W., Kita, Y., Frank, D. J., Majewski, R. R., Konicek, B. A., Nobrega, M. A., Jacob, H., Walterhouse, D., and Iannaccone, P. (2002). Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem* **277**, 5548-55.
- Zeller, R. (2004). It takes time to make a pinky: unexpected insights into how SHH patterns vertebrate digits. *Sci STKE* **2004**, pe53.

SUMMARY

Cell Cycle control during the neural tube development: Cyclin D1 and CDC25B expression are regulated by the Shh signalling pathway.

During the early steps of spinal cord development, the neural plate located posteriorly invaginates to form the neural groove and progressively closes to give rise to the neural tube in more anterior regions. FGF signalling promotes the continuous development of the posterior nervous system by maintaining a stem zone of proliferating neural progenitors in the caudal neural plate. The progenitors that escape from this region are subjected to dorso-ventral polarising activities in the neural groove, due notably to Sonic Hedgehog (Shh), and some of them start to differentiate in the neural tube. The protein Shh, which is secreted by ventral structures in the groove, controls both the specification and proliferation of ventral neural progenitors. While the molecular mechanisms leading to neuronal specification are quite well known, the molecular bases of the proliferative effect of Shh remain elusive.

In order to understand how Shh can control proliferation in this context we looked for cell cycle regulators that could be target of this pathway in the ventral part of the chick neural tube. We first investigated the expression pattern of D-type Cyclins, because of their role in coupling extra-cellular signals to the cell cycle machinery. We have found that *Cyclin D2* is preferentially expressed in the caudal neural plate, whereas *Cyclin D1* is present in the ventral neural groove. We demonstrated, by loss- and gain-of-function experiments, that FGF signalling maintains *Cyclin D2* in the immature caudal neural epithelium, whereas Shh specifically activates *Cyclin D1* in the ventral neural groove.

We next analysed the expression pattern of other cell cycle regulators. Interestingly, we found that the phosphatase CDC25B, which promotes the G2/M transition, is expressed in a spatial and temporal manner that is consistent with its being a target gene of Shh. Thus, *CDC25B* is expressed asymmetrically in the Hensen's node, in a ventro-dorsally decreasing gradient in the neural groove and also in the posterior part of the developing limb buds. Loss- and gain-of-function experiments demonstrated that Shh positively regulates the expression of *CDC25B* both in the neural tube and in the limb buds. These data reveal an unexpected developmental link between the Shh pathway and a regulator of the G2/M transition.

To test the relevance of Shh function on the cell cycle regulation we analysed cell cycle parameters after Shh pathway inhibition. The blockade of the Shh signalling pathway leads to an accumulation of the cells in G1 and a default of entry in mitosis. The effects of Shh on the G1 phase can be due to the regulation of Cyclin D1 expression. Accordingly we have demonstrated that the misexpression of Cyclin D1 in the neural tube favours proliferation of neural precursor cells at the expense of differentiation. The function of CDC25B in the neural tube has not yet been related to the function of the Shh pathway at the G2/M transition. Then the importance of Shh-dependent activation of *CDC25B* in the ventral spinal cord needs further investigations.

All together these results show that two cell cycle regulators, Cyclin D1 and CDC25B, are targets of Shh signalling in the ventral spinal cord. Our evidence suggests that Shh acts positively on proliferation at two different cell cycle phases: G1 progression and G2/M transition. The control of G1 progression may serve to maintain discrete pools of cycling neural progenitors. The significance of the control of the G2/M transition remains to be elucidated. It nevertheless seems clear that, by virtue of its ability to regulate the cell cycle, Shh can coordinate proliferation with the neuronal specification programme in order to impose a pattern in the ventral spinal cord.

Auteur : Bertrand BENAZERAF

**Titre : Contrôle de la prolifération cellulaire et développement du tube neural :
régulation de l'expression des acteurs du cycle cellulaire Cycline D1 et CDC25B
par le morphogène Shh.**

Directeur de thèse : **Fabienne PITUELLO**

Soutenue le 4 Novembre 2005

Résumé des travaux

Chez les Vertébrés, la moelle épinière se développe à partir de la région postérieure de la plaque neurale. La plaque neurale se ferme progressivement pour donner la gouttière puis le tube neural au cours de l'allongement antéro-postérieur de l'embryon. Les précurseurs neuraux sont soumis à l'action de morphogènes comme Sonic Hedgehog (Shh) au niveau de la gouttière neurale. La protéine Shh qui est sécrétée par les structures ventrales de la gouttière et du tube neural contrôle à la fois la prolifération et la spécification des précurseurs neuraux ventraux. Si les mécanismes moléculaires qui mènent à la spécification neuronale commencent à être bien connus, les bases moléculaires de l'action proliférative de Shh restaient à élucider.

Pour comprendre comment Shh contrôle la prolifération dans l'ébauche de moelle épinière j'ai utilisé l'embryon de poulet comme modèle d'étude. J'ai observé que deux régulateurs du cycle cellulaire : *Cycline D1* et *CDC25B* sont exprimés dans la partie ventrale de la gouttière neurale. Les Cyclines D sont connues pour leur rôle dans le couplage des signaux extracellulaires avec la progression des cellules en phase G1 du cycle. La phosphatase CDC25B est connue pour promouvoir la transition G2/M. J'ai démontré par des expériences de perte et de gain de fonction que l'expression de *Cycline D1* et de *CDC25B* est régulée par la voie de signalisation Shh dans la partie ventrale de la gouttière neurale. L'inhibition de la voie dans le tube neural entraîne un blocage des cellules en phase G1 et à la transition G2/M. La surexpression de *Cycline D1* dans le tube neural favorise la prolifération cellulaire au détriment de la différenciation neuronale. Ces données suggèrent donc que Shh pourrait maintenir en prolifération certaines populations de précurseurs neuraux par l'activation de la *Cycline D1*.

Ce travail a donc permis l'identification de *Cycline D1* et *CDC25B* comme des cibles de Shh. Il suggère que Shh agit positivement sur la prolifération à deux phases du cycle cellulaire : la progression en G1 et la transition G2/M. Le contrôle de la progression en G1 pourrait servir à maintenir certains précurseurs en prolifération, la signification du contrôle à la transition G2/M reste à être déterminé. Cette étude nous permet de mieux comprendre par quels mécanismes la voie de signalisation Shh va coordonner la prolifération avec la spécification dans le tube neural.

Mots clés : développement, système nerveux central, prolifération, Shh, Cyclines D, CDC25B, Vertébrés, poulet.

Centre de Biologie du Développement, UMR5547 CNRS/UPS,
118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 4