

## **Processus morphogénétiques**

M. Alain PROCHIANTZ, membre de l'Institut  
(Académie des sciences), professeur

### **Évolution du système nerveux, robustesse et plasticité**

#### **Robustesse et plasticité**

Le cours de l'année 2008/2009 s'est intéressé à l'évolution du système nerveux. Il a commencé sur des considérations théoriques portant sur les concepts de robustesse et de plasticité. Bien entendu, les questions d'évolution ont été reliées à celles du développement dans une perspective Evo/Devo. Nous avons introduit la notion d'évolvabilité définie par la capacité de répondre à une modification de l'environnement par la création de formes (au sens large) nouvelles présentant un avantage sélectif.

Nous avons discuté l'hypothèse qu'il existe dans le paysage « Génotype vers Phénotype » des zones neutres au sein desquelles les mutations ne modifient pas le phénotype. Ces espaces neutres, synonymes de robustesse, augmentent l'évolvabilité en permettant de naviguer sans contrainte au sein de ce « paysage » et d'approcher des régions qui peuvent permettre des transitions parfois brutales. Si ces glissements n'étaient pas possibles, alors le système serait trop contraint pour quitter une zone d'adaptation forte.

Pour illustrer un propos attribuant une part importante aux phénomènes épigénétiques, nous avons introduit les protéines de choc thermique et décrit, chez la drosophile et chez le poisson, comment leur inhibition pharmacologique peut faire apparaître des phénotypes sous-jacents, avec, chez la drosophile, la possibilité d'une fixation, pendant plusieurs générations, du phénotype révélé, y compris après retrait de l'inhibiteur pharmacologique.

### **À partir de quand peut-on parler de système nerveux ?**

Cette partie du cours nous a amenés à discuter la notion même de système nerveux. Cela a été fait en nous fondant sur la perception lumineuse chez les unicellulaires. Nous sommes partis de l'idée de séparer le stimulus lumineux qui est dépendant des structures sensibles aux photons, de l'analyse de ce stimulus qui nécessite des centres nerveux.

Nous avons comparé les structures des récepteurs aux photons chez les bactéries, les eucaryotes unicellulaires et les métazoaires, ce qui nous a permis d'introduire la question, aujourd'hui encore débattue, de l'origine monophylétique ou polyphylétique de l'œil. Nous avons présenté les thèses en présence et pris parti, avec Walter Gehring, pour une origine monophylétique. Ce point a été rediscuté plus loin dans le cours.

Nous avons pris comme exemple d'œil « primitif » le cas de *Chlamydomonas* et de son « eye spot » qui fonctionne comme un appareil visuel avec des protéines photoréceptrices qui, associées à des canaux ioniques, régulent la rotation des flagelles et le mouvement de l'unicellulaire vers la lumière ou, au contraire, dans la direction opposée et ce, en fonction de l'intensité lumineuse. Sans aller jusqu'à parler de système nerveux, nous avons là un organe qui permet à l'unicellulaire de percevoir une ombre, celle d'un prédateur par exemple, ou de fuir une intensité lumineuse trop forte en mettant en action des canaux ioniques et en activant un système moteur.

Il est intéressant de relier ces observations à l'hypothèse de Walter Gehring qui fait remonter la perception de la lumière aux cyanobactéries qui se sont intégrées dans les eucaryotes sous la forme des chloroplastes. Gehring propose que les dinoflagellés, symbiontes connus des cnidaires, auraient pu transférer leurs gènes de photoréception aux cnidaires (de la même façon qu'ils ont incorporé ceux des cyanobactéries). La sensibilité à la lumière, née chez les cyanobactéries, serait passée aux algues rouges sous la forme de chloroplastes primaires, puis aux dinoflagellés et, de là, aux cnidaires, dont la position est très ancienne dans l'arbre phylogénétique.

### **Histoire d'œil**

Dans cette partie du cours, nous nous avons continué d'explorer l'évolution du système visuel, cette fois-ci chez les métazoaires. Dans un premier temps nous avons présenté les récepteurs de type rhabdomérique et ceux de type ciliaire et utilisé cette distinction pour éclairer un point d'évolution concernant nos propres cellules ganglionnaires (RGCs). Nous avons suivi Detlev Arendt et ses collègues et montré que chez les polychaetes on trouve les deux types de récepteurs et que ces récepteurs n'ont pas véritablement disparu chez les vertébrés mais ont donné naissance aux cellules ganglionnaires de la rétine.

Nous sommes remontés plus haut dans l'évolution pour constater que *Ciona intestinalis*, le protochordé le plus proche des vertébrés a un organe photosensible (ocelle) qui contient quelques photorécepteurs ciliaires et une large cellule pigmentaire (pratiquement le prototype de Darwin). La lumière chez la Cione est hyperpolarisante (comme chez les vertébrés) et il n'y a qu'une seule opsine.

Ce qui a permis de proposer le scénario évolutif suivant : un chordé primitif avec une paire d'organes photorécepteurs du type amphioxus ou Cione (qui en a probablement perdu 1), s'est étendu latéralement et s'est développé en une rétine à 2 couches, avec des photorécepteurs ciliaires contactant des neurones de projection (probablement des récepteurs rhabdomériques) donnant un œil de type mixine générant un comportement circadien et une capacité de reconnaître les ombres. La suite est l'acquisition d'une lentille (lamproie) et une augmentation de la capacité computationnelle par introduction des cellules bipolaires entre les photorécepteurs et les RGCs. Ce serait alors mise en place une projection des RGCs vers le thalamus (et plus seulement l'hypothalamus).

Nous sommes alors revenus sur la controverse sur le caractère monophylétique ou polyphylétique de la vision. Les trois grands exemples sont les vertébrés, les arthropodes et les mollusques (céphalopodes). On a longtemps pensé que les origines des yeux dans ces trois embranchements étaient différentes, du fait des origines différentes des tissus qui composent l'œil, évoquées plus haut.

Chez les céphalopodes, c'est l'invagination de l'ectoderme qui est à l'origine de l'œil alors que chez les vertébrés une composante cérébrale est décisive (rétine et épithélium pigmentaire), inductrice de la lentille (ectoderme). Chez les arthropodes, on a des yeux composés (à facette) d'origine ectodermique comme chez les céphalopodes, mais d'organisation très différente. Chez la praire ou la coquille Saint-Jacques (bivalve) les yeux ne sont pas d'origine céphalique.

Pour certains, ces différences suggèrent des origines distinctes et plaident en faveur d'une évolution convergente. Les yeux auraient évolué de façon indépendante et à plusieurs reprises, pour certains auteurs de 40 à 65 fois. C'est assez impensable. C'est chez Gehring qu'on trouve l'argumentation la plus solide en faveur de l'origine monophylétique. À partir des mutations *eyeless* (mouche), *small eye* (souris) et *aniridia* (humain), le « même » gène Pax6 a été cloné. Cette conservation suggère fortement que Pax6 a joué un rôle dans le développement de l'œil de Bilateria puisque, si arthropodes et vertébrés en ont besoin pour construire l'œil, leur ancêtre commun aussi, probablement.

On peut donc suivre Gehring quand il propose que tous les yeux des Bilateria remontent au prototype darwinien similaire à celui des planaires mais que la suite repose sur des processus d'évolution divergente, convergente ou parallèle. Gehring nous propose deux hypothèses évolutives. Dans un premier schéma, les métazoaires se sont formés par le rassemblement d'une colonie de cellules flagellées et on a assisté à une spécialisation ultérieure en pigmentaires et réceptrices.

Dans un deuxième schéma, Gehring reprend l'hypothèse du symbionte, fondée sur *Chlamydomonas*, avec l'intuition que la perception de la lumière remonte aux cyanobactéries qui se sont intégrées dans les eucaryotes sous la forme des chloroplastes. Gehring, nous l'avons vu, propose que les dinoflagellés auraient transféré leurs gènes de photoréception aux cnidaires, dont ils sont les symbiontes.

Les études sur l'expression de Pax6 au cours du développement sont limitées aux arthropodes et vertébrés. L'origine des gènes Pax est antérieure à celle des yeux et du système nerveux puisqu'on les trouve chez les éponges et que les yeux n'apparaissent qu'avec les cnidaires. Mais, même chez les cnidaires, on ne trouve pas d'homologues directs de Pax6.

Cependant, Pax B qui a très probablement donné par duplication d'une part Pax4/6 et de l'autre Pax2/5/8 est exprimé dans les yeux des hydrozoaires (*Cladonema*) et cubozoaires (*Tripedalia*) qui sont des cnidaires. On peut faire l'hypothèse que PaxB chez ces espèces joue le rôle de Pax6 dans le développement des yeux, mais que l'implication directe de Pax6 ou du « consortium » génétique Pax-Six-Eya-Dach est postérieure à la divergence entre les cnidaires et les organismes à symétrie bilatérale.

Pour conclure, nous ne pouvons oublier que des organismes qui n'ont pas d'yeux (comme les cnidaires ou, plus proche de nous, les nématodes), expriment aussi les gènes Pax. Mais cela ne saurait être pris comme argument contre une origine monophylétique. On peut en effet proposer que l'invention de l'œil ou de la vision s'est faite à partir d'un perfectionnement de la chémoréception ; c'est même probable.

### **Les premiers métazoaires**

En fait, nous nous sommes, dans cette partie du cours, intéressés à l'origine de la multicellularité. En effet, l'association des cellules en ensembles pluricellulaires constitue une transition majeure dans l'histoire de la vie et de la division du travail au sein d'un organisme. Cette transition est à la fois importante et énigmatique. Elle s'est produite à de nombreuses reprises (algues, plantes terrestres qui en descendent, champignons, animaux, amibes), mais ne s'est pas stabilisée dans tous les taxons.

Deux mécanismes pouvant conduire à la multicellularité sont discutés par les spécialistes. Le premier consiste à ne pas se séparer après division. Le second consiste à rassembler des éléments dispersés. Dans le premier cas, les cellules sont génétiquement homogènes et l'hétérogénéité ne peut venir que de modifications « accidentelles » du génome, par exemple une mutation somatique, ou une infection par un pathogène. De ce fait, la différenciation en différents types cellulaires ou en différents groupements, une forme d'organogenèse, relèvera surtout de mécanismes épigénétiques.

Dans le développement par agrégation comme chez certains ciliés, myxomycètes, ou myxobactérie, et chez dictyostelium, c'est la forme individuelle qui prédomine, avec une association épisodique. Dans ce système, la variété génétique vient de l'association d'individus aux génotypes différents et si on pense en terme de compétition, alors elle sera intra-propagule et non inter-propagules comme dans le premier cas qui, selon les évolutionnistes, est probablement à l'origine de la plupart des organismes multicellulaires.

Dans un cas comme dans l'autre, il nous faut rechercher des gènes de la multicellularité qui seraient déjà présents chez les eucaryotes unicellulaires et auraient comme double mission de permettre de tel rassemblements, des molécules d'adhésion par exemple, et de favoriser la communication intercellulaire et la différenciation cellulaire et spatiale. On doit cependant s'interroger sur la fonction de tels gènes de « future multicellularité » chez des êtres unicellulaires. Ou bien ces gènes servaient à autre chose et ont été réutilisés dans une fonction de type « on se rassemble », « on reste ensemble », ou bien ils servaient déjà à une interaction cellulaire. Dans ce cas, l'origine de la pluricellularité se trouverait dans l'interaction de deux unicellulaires, par exemple dans leur sexualité.

La multicellularité impose le développement d'un codage positionnel pour les cellules. Nous avons introduit ici la notion d'information de position et donné quelques éléments sur l'évolution des gènes qui portent cette information. À cette occasion nous sommes revenus sur l'orthologie (homologie à travers l'évolution) et la paralogie (homologie née d'une duplication d'un gène accompagnée, souvent, de l'acquisition de nouvelles propriétés par un des deux gènes issus de là duplication). Nous avons pris l'exemple d'Otd et Otx2, deux orthologues chez la drosophile (Otd) et les vertébrés (Otx2), et d'Otx2 et Otx1, deux paralogues chez les vertébrés.

### **Devant/Derrière et Dessus/Dessous**

La multicellularité appelle une information de position. Dès que nous avons affaire à 2 cellules et que cet assemblage est plus que  $1 + 1$ , une différenciation doit s'ensuivre dont le premier pas est de savoir qui est devant et qui est derrière, qui est dessus et qui est dessous. En m'en tenant à deux embranchements (arthropodes et vertébrés), je suis parti d'un gène « de l'avant », c'est-à-dire Otx2 et ses orthologues que l'on trouve dès les premiers métazoaires, en tout cas déjà chez les cnidaires.

Le système nerveux central antérieur de la mouche est composé de trois ganglions, proto-, deuto- et trito-cerebrum et Otd est exprimé essentiellement dans les deux premiers ganglions. De même Otx2 est exprimé, chez la souris, depuis l'avant du cerveau jusqu'à la frontière entre métencéphale et mésencéphale. La délétion d'Otd chez la mouche et d'Otx2 chez la souris conduit au même phénotype de perte du cerveau antérieur. D'où une homologie évolutive (orthologie) des gènes qui se retrouve aussi au niveau des sites d'expression et de la fonction. En effet, si on remplace Otd par Otx2 de souris ou humain, la mouche retrouve la tête. D'où la question : le gène de mouche peut-il remplacer le gène murin ?

La réponse est non si on insère juste les séquences codantes. Par contre, si on introduit les séquences régulatrices du gène de souris, avec la séquence codante de la mouche, on récupère un avant suffisamment développé confirmant l'homologie fonctionnelle. Cela souligne le rôle très important des séquences régulatrices. Les séquences codantes doivent être exprimées au bon moment, au bon endroit, aux bonnes quantités et pendant la durée adéquate.

La comparaison entre développement du système nerveux chez les arthropodes et les vertébrés, faisant apparaître des différences notables, plus l'existence d'un système diffus chez les hémichordés, avait conduit certains, dont Peter Holland, à poser l'hypothèse d'une origine différente du SNC chez les arthropodes et les vertébrés. Ce qui laissait ouverte la question de l'organisation du système nerveux chez Urbilateria (l'ancêtre des animaux à symétrie bilatérale) et plaidait pour un système plutôt diffus considéré comme « moins évolué ». Cette hypothèse a été invalidée par l'analyse des annélides dont le système nerveux est très proche de celui des vertébrés quant au patron dorso-ventral (DV) d'expression des gènes de développement.

Le caractère premier de la centralisation du système nerveux réside dans la ségrégation entre ectoderme neural et ectoderme non neural au cours du développement précoce. Cette séparation est suivie d'une division de l'ectoderme neural en sous-territoires et de la ségrégation des types neuronaux au sein de ces sous-territoires. La division entre ectoderme neural et non neural à partir d'un ectoderme initialement entièrement non neural correspond à l'induction neurale.

Après plus de 50 ans de course à l'inducteur neural, nous sommes arrivés à la conclusion que l'ectoderme a une tendance naturelle à donner du système nerveux et que cette tendance est bloquée par un morphogène (BMP/DPP). L'induction neurale consiste donc à inhiber cette inhibition par l'expression de protéines qui bloquent l'activité BMP, comme les Chordins ou Noggin. Si DPP/BMP bloque la neuralisation, on en conclura facilement que chez la plupart des bilatérés le système nerveux se développe du côté du corps qui n'exprime pas DPP/BMP.

C'est vrai, nous venons de le voir, chez les vertébrés ; ce l'est aussi chez les arthropodes et les annélides. Ce qui pose une autre question pour ce qui est de notre parenté évolutive avec les arthropodes. En effet, chez les arthropodes, DPP/BMP n'est pas exprimé en position ventrale, mais dorsale. Le système nerveux des arthropodes est donc ventral et non dorsal comme chez les vertébrés, en accord avec la règle de l'inhibition par les DPP/BMP. En 1875, Anton Dohrn suggère que les vertébrés ont hérité leur SNC d'un ancêtre annélide et inversé leur axe DV au cours de l'évolution. Cette idée d'une inversion, déjà défendue par Geoffroy Saint-Hilaire en 1822, a été confirmée par les expériences récentes sur les patrons d'expression de morphogènes (DPP/BMP) et des gènes de développement. D'autres hypothèses existent, celle par exemple de la rotation, chez les vertébrés, de l'axe du corps par rapport à celui de la tête. Bien que rassemblant peu de suffrages, une telle rotation donnerait une explication au phénomène de décussation spécifique des vertébrés.

## Tracer des bords

Les concepts de compartiment et de frontière entre compartiments sont nés des travaux menés chez la *Drosophile*. Les frontières ont plusieurs fonctions, elles constituent des obstacles à la migration des cellules, des bords à suivre pour la migration des axones et des centres de signalisation. Ces centres de signalisation participent au « patterning » des tissus embryonnaires en réglant la sécrétion d'oncogènes et de morphogènes, parfois sous une même forme moléculaire (Wnt, FGF, ...).

Cette segmentation des vertébrés fut redécouverte par Lumsden et Keynes en 1989 sur le cas du rhombencéphale. Je dis « redécouverte » à cause du caractère pionnier de la proposition d'Étienne Geoffroy Saint-Hilaire en 1822. Mais parler de redécouverte est un peu exagéré. Si, dans un cas comme dans l'autre, la première observation est anatomique, ce qui emporta l'adhésion en 1989 fut le corrélat génétique de l'expression des gènes Hox et l'orthologie entre les gènes Hox de la mouche et des vertébrés qui permettait de penser cette orthologie aussi au niveau anatomique.

C'est donc le corrélat entre génétique et anatomie ou plutôt une forme de congruence entre orthologie génétique et orthologie anatomique qui autorise en 1989 à étendre aux vertébrés un concept de segmentation jusque là réservé à certains invertébrés, dont les arthropodes.

Le cerveau antérieur qui donnera naissance au télencéphale, diencéphale et mésencéphale présente aussi des renflements et constriction provisoires du neurépithélium, qui suggèrent l'existence de « compartiments ». Cette configuration anatomique comme le patron d'expression de nombreux gènes a permis l'émergence d'une conception neuromérique du cerveau antérieur qui désigne une forme de compartimentation antéro-postérieure (AP). Par ailleurs, une compartimentation DV est aussi présente.

Le modèle prosomérique, proposé par Puellas, Rubenstein et collègues dans les années 1990 a eu une réelle influence sur notre façon de penser le développement et l'évolution du cortex. Ce modèle proposait une division du cerveau – le long de l'axe AP – en 6 segments ou prosomères (métamères du prosencéphale) : P1 à P3 pour le diencéphale et P4-P6 pour l'hypothalamus et le télencéphale. Il est tout à fait remarquable que ces frontières AP comme DV se situent presque toujours sur les lignes de partage d'expression de gènes de développement.

À ce point, nous avons introduit l'hypothèse née du travail de notre laboratoire selon laquelle certains facteurs de transcription sont eux-mêmes des morphogènes, donc des molécules capables de transduire un signal et que les bords se forment là où ils se « rencontrent » au sein du neuroépithélium. Cette idée a été développée plus tard.

En attendant, nous avons fourni quelques informations sur le développement du cortex. D'abord, de quels neurones sont composés le cortex ? Pour 80 % d'entre eux, il s'agit de neurones pyramidaux glutamatergiques, excitateurs, générés dans

la zone ventriculaire (subventriculaire). Les autres 20 % sont des neurones GABAergique, inhibiteurs, qui sont générés dans les régions ventrales, les éminences ganglionnaires, médianes, latérales (et caudales), du télencéphale et migrent de façon tangentielle pour rejoindre le télencéphale dorsal.

Le télencéphale se forme à partir du prosencéphale, à l'avant de cette structure qui donne aussi, plus postérieurement, le diencéphale et le mésencéphale. La formation du télencéphale se fait vers E8.5 avec l'expression du facteur de transcription *Foxg1*. Dès l'expression de *Foxg1*, le télencéphale dorsal se divise en sous régions, à commencer par une région antérieure et latérale qui va donner le néocortex et une région postérieure et médiane qui va donner l'hippocampe, « l'ourlet cortical » et le plexus choroïde.

Le télencéphale ventral se divise en une région médiane (MGE) et deux régions latérales et caudales (LGE et CGE), les éminences ganglionnaires. Ces régions donneront les ganglions de la base, et les structures limbiques associées (amygdale et accumbens). MGE produit aussi les neurones GABA à somatostatine ou parvalbumine (PV) et les interneurons NPY des ganglions de la base et du cortex (après migration). La CGE produit les interneurons à calretinine et VIP. La LGE produit des interneurons du bulbe olfactif plus des neurones des projections inhibitrices du striatum et des aires limbiques.

Nous avons introduit dans ce schéma une autre interaction entre *Lhx 2* et *Lhx5*. *Lhx5* est exprimé dans l'ourlet cortical et sa perte entraîne celle du plexus choroïde. *Lhx2* est exprimé dans la zone ventriculaire, selon un gradient et est fortement réprimé par *BMP2/4* (dorsal) ce qui l'exclue de l'ourlet cortical. La perte de *Lhx2* conduit à une expansion de l'ourlet et du plexus au dépend du néocortex. Il s'agit d'un autre exemple de ces antagonismes qui apparaissent de plus en plus comme représentatifs d'une loi générale.

### **Du traçage des bords à une hypothèse sur l'évolution de la signalisation**

Cette loi peut s'exprimer de la façon suivante. Au départ nous avons 2 morphogènes, par exemple dorsal et ventral comme *BMP* et *Shh* dans le tube nerveux, plus généralement, A et B. A induit HA et B induit HB, deux homéogènes, mais HA réprime HB et HB réprime HA. Il peut s'ensuivre l'expression de 2 gradients, un gradient de HA et un gradient de HB. Ces deux facteurs de transcription peuvent se trouver exprimés transitoirement dans les mêmes cellules, mais du fait qu'ils sont auto-activateurs et inhibiteurs réciproques (notre loi générale), alors le gagnant prend tout et, sauf élément de régulation supplémentaire permettant la co-existence, un bord se forme. Il est ici assez clair que ce bord admet, du fait des fluctuations, une certaine variabilité, sauf à invoquer un élément assurant une plus grande robustesse.

Mais nous savons former un patron avec un seul morphogène. Nous avons même admis que pour le tube nerveux l'invention du deuxième morphogène (*Shh*) répond à un agrandissement de la structure qui rend le premier morphogène



(BMP) inopérant parce qu'il ne peut pas diffuser assez loin. Dans un tel cas, comment faire un bord sauf à imaginer que le gradient de A se traduit en l'expression d'homéogènes HA1, HA2, HA3 (classe A), comme dans le modèle du drapeau français de Wolpert, c'est à dire avec des seuils ? Mais les seuils admettent un certain niveau de variabilité qui fait que le bord ne peut être net que si on ajoute une hypothèse supplémentaire. Comme dans le cas précédent nous proposons que pair active pair, impair active impair et que pair et impair s'inhibent réciproquement. Alors le cas précédent devient une variante du second cas avec classe A et classe B.

Avant d'explorer plus avant ce modèle, nous avons rappelé que l'expression d'homéogènes, ou d'autres gènes de développement, ne suffit pas à former des bords, il faut évidemment des cibles qui effectuent le travail. Les Ephrins et leurs récepteurs Eph par exemple, mais aussi d'autre effecteur, molécules d'adhésion (NCAM, cadhérines) ou le système Notch-Delta, et d'autres encore. Si on réfléchit un peu à la question, la nature même de ces facteurs qui sont tous, molécules d'adhésion comprises, des molécules de signalisation, fait que les bords ne sont pas morts. En fait, c'est là que ça se passe, là que « ça bouge ».

Les homéoprotéines, cela a été démontré dans notre laboratoire, sont des molécules qui transduisent un signal, au bord justement. On peut étendre cette notion de bord, pour proposer qu'elle s'applique à tout contact entre cellule. Et ces échanges – homéoprotéines comprises – que nous avons explorés à propos des étapes précoces de la formation de ce système nerveux sont, à mon sens, probablement fonctionnels au niveau cellulaire, tout particulièrement au niveau de la synapse, un bord parmi d'autres.

Ces propositions ne sont pas sans conséquences sur le plan de l'évolution puisque ces homéoprotéines exprimées chez tous les multicellulaires, dès le début, sont très probablement – en tout cas c'est l'hypothèse que je forme – les plus anciennes des molécules de signalisation, d'une signalisation pas très robuste, la robustesse ayant résulté de l'invention des autres molécules plus classiques.

Mais si les homéoprotéines sont les premières molécules de signalisation, comment ont-elles pu – sans protéines effectrices – exercer leur activité ? Nous proposons que les premières signalisation ont impliqué l'activité mitochondriale et une synthèse d'ATP régulée par les homéoprotéines et capable de jouer sur l'état du cytosquelette et sur la localisation des molécules de surface. C'est là un schéma parcimonieux impliquant très peu de classes de molécules, des molécules dont nous savons que leur existence a forcément précédé l'invention de la multicellularité, y compris pour les homéoprotéines dont la fonction première aurait pu être de réguler la conjugaison chez les organismes unicellulaires.

Pour revenir un peu en arrière, nous avons comparé le modèle classique des morphogènes à celui que nous proposons, fondé sur le transfert intercellulaire d'homéoprotéines. Dans le modèle classique, un morphogène diffuse à partir d'une

source et induit l'expression, en gradient (ou non) de deux facteurs (pas forcément de transcription) qui s'inhibent réciproquement. Au niveau où les deux facteurs se rencontrent, leur inhibition réciproque entraîne la formation d'un bord, mais ce bord est initialement irrégulier. S'il s'agit de facteurs de transcription, ils doivent être transitoirement co-exprimés dans les mêmes cellules. La régularisation demande soit de la mort cellulaire, soit un changement d'identité, soit une migration.

Le deuxième modèle que nous avons proposé est que les morphogènes ne diffusent pas énormément mais induisent un homéogène. L'homéoprotéine passe de cellule à cellule et s'auto-induit, on peut donc la considérer comme « infectieuse ». Elle rencontre alors une autre homéoprotéine, qui vient en sens inverse et a la même propriété d'auto-induction, mais les deux sont inhibitrices réciproques, d'où la formation d'un bord.

Nous avons alors comparé les deux modèles en réinterprétant les données de la littérature, en particulier celles qui concernent la position des bords et donc la surface des territoires dans le système nerveux central, dans le cadre des hypothèses classiques et dans le cadre de celles que nous avons avancées récemment sur la base de nos propres observations.

### **Le début de sapiens**

Nous avons abordé plusieurs points, mais je ne développerai ici que la partie dédiée à la taille générale du cortex et celle des aires spécifiquement dédiées à différentes modalités, sensorielles, motrices et cognitives.

Les différentes espèces présentent des cortex de tailles différentes. L'augmentation de la taille générale (le cas écéhant), peut se traduire, ou non, par l'apparition de nouveaux champs corticaux qui s'ajoutent aux champs préexistants. Mais, en dehors de l'augmentation de la taille générale, ou de son maintien, on observe aussi des modifications des tailles relatives des différentes aires et des modifications à l'intérieur d'une même aire. Par exemple, chez *platypus* (l'ornithorynque), on constate non seulement une augmentation de S1 (aire somato-sensorielle primaire), mais aussi à l'intérieur de S1, une augmentation de la représentation du bec qui occupe pratiquement 90 % de la surface sensorielle. Cette augmentation est en relation avec la densité des récepteurs sensoriels sur le bec et les modifications associées dans le comportement de l'animal.

D'autres modifications aussi remarquables sont rencontrées chez la chauve-souris, dont le cortex auditif est en proportion avec les modifications de la cochlée liées à l'importance de l'écholocalisation chez cet animal. Pour faire bonne mesure, notons la taille de la main chez le primates, ou les représentations sensorielles du larynx, des lèvres ou de la langue chez *sapiens*. Cette dernière série de modifications est en rapport avec le développement des structures orales et elles sont accompagnées de modifications parallèles, dans le même sens, au niveau moteur ou prémoteur. Les aires dites de Broca

sont des aires motrices et prémotrices et leur agrandissement chez *sapiens* est en rapport avec la production de la parole, spécifique de notre espèce.

Avant de passer à l'analyse des mécanismes qui permettent de comprendre les modifications de taille du cortex, son agrandissement important chez *sapiens* tout particulièrement, je conclus provisoirement sur l'importance, pour ce qui est des variations de la taille relative des aires, des niveaux d'expression des morphogènes et des facteurs de transcription, en particulier ceux qui définissent les bords. En ajoutant qu'il ne faut pas oublier que des modifications à la périphérie, par exemple dans l'expression des gènes Hox, qui conduisent à des modifications des organes à la périphérie, par exemple des modifications de la taille de la main, seront reflétées au niveau cortical.

Les changements que l'on peut observer entre espèces concernent presque toujours la taille du feuillet cortical, en comparaison avec celle du corps. Ces variations sont considérables. Après 200 millions d'années d'évolution, la taille du cerveau, du cortex surtout, peut varier d'un facteur 1 à 100 000 chez les quelque 4 600 espèces vivantes de mammifères.

Dans un petit nombre d'espèces, dont la nôtre, l'encéphalisation s'est accompagnée d'une augmentation du nombre des champs corticaux et de changements dans la connectivité de ces champs corticaux. Mais ces augmentations de taille, dont l'origine sera toujours le fruit d'une régulation de la prolifération ou de la survie cellulaire, peuvent cacher plusieurs phénomènes. Pour s'en convaincre, on peut comparer les rongeurs et les primates.

Chez les rongeurs, la taille du cerveau est une fonction hyperbolique du nombre des neurones et le rapport glie/neurone augmente avec la taille du cerveau. Si on appliquait la même loi hyperbolique aux primates, avec 100 milliards de neurones, nous aurions un cerveau de 45 kg et un corps de 109 tonnes. Chez les primates, la densité neuronale reste constante. La taille des neurones ne change pas et la croissance du cerveau est isométrique. Si le cerveau est 11 fois plus gros, il y a 10 fois plus de neurones et 12 fois plus de glies. En appliquant à *sapiens* la règle « linéaire », on arrive, toujours pour 100 milliards de neurones, à 1,4 kg de cerveau pour une taille de 1,70 m.

L'augmentation de la taille du cortex peut résulter de plusieurs phénomènes. Par exemple, une extension du temps pendant lequel prennent place les divisions symétriques des précurseurs du neuroépithélium, la vitesse de division, ou le taux de mort cellulaire. Cette augmentation peut refléter un allongement de la période de croissance du cerveau. L'hypothèse de la division des progéniteurs est confortée par le fait que les progéniteurs corticaux se divisent 11 fois chez la souris, au moins 28 fois chez le macaque et probablement beaucoup plus chez l'homme.

Au cours de nos descriptions, nous avons insisté sur l'accroissement chez *sapiens* du volume des éminences ganglionnaires médianes. Cette augmentation entraîne celle du nombre de neurones GABA, aussi expliquée par le fait que chez *sapiens*

ces neurones sont aussi générés à partir de la zone ventriculaire corticale. De ce fait, on peut dire que l'accroissement du cortex chez les primates, chez *sapiens* au plus au point, correspond à une augmentation du nombre de neurones glutamatergiques et GABAergiques dans les couches superficielles du cortex (II et III, principalement).

À propos de l'augmentation importante de ces interneurons inhibiteurs, on notera la remarque désabusée de Santiago Ramon y Cajal : « L'opinion généralement acceptée à cette époque que les différences entre le cerveau des mammifères autres que l'homme (chat, chien, singe, etc.) et celui de l'homme sont seulement quantitatives, me semblait peu probable et même un peu offensante pour la dignité humaine... Mes recherches ont montré que la supériorité fonctionnelle du cerveau humain est intimement liée à la prodigieuse abondance et l'inhabituelle richesse de formes des neurones dits à axone court. »

### Être et ne pas être un animal

Sur le plan anatomique, les humains contemporains sont apparus il y a 130 000 à 160 000 ans en Afrique et ont commencé à migrer hors d'Afrique entre 50 000 et 100 000 ans ; en Australie il y a 50 000 ans ; au Nouveau Monde il y a 13 500 ans ; en Polynésie il y a 1 500 ans. Bref en 100 000 ans, *sapiens* a colonisé 70 % de la planète, un exploit qui surpasse d'un facteur 10 les colonisations effectuées par les autres mammifères.

Nous sommes 6 milliards, donc le nombre d'hominiens (depuis 5 millions d'années) qui a vécu serait de l'ordre de 150 milliards d'individus. À un taux de mutation de  $7 \times 10^{-5}$  par gène et par personne, on devrait observer aujourd'hui une importante diversité génétique. Ce qui n'est pas le cas et suppose que nous dérivons, en fait, d'une petite population originelle (environ 10 000 individus). Si on ajoute à cette évidence le petit nombre de gènes qui est le nôtre, il est clair que les questions de régulation l'emportent sur celles de la quantité ou de la nature des gènes.

On se pose souvent la question de savoir si *sapiens* continue d'évoluer. La réponse la plus spontanée est non, ce qui met le poids sur l'adaptation culturelle et technique sur laquelle j'aurais aimé clore le cours de cette année. Mais en fait, l'évolution génétique continue aussi. Par exemple, la délétion de CCR5, un récepteur aux cytokines, augmente en fréquence, sans doute ou peut-être parce qu'elle entraîne une résistance au HIV. De fait, les maladies infectieuses constituent une force sélective puissante au regard de l'évolution humaine.

Le débat sur l'évolution, en ce qui concerne la lignée humaine, s'est déroulé dans les termes posés par l'équation suivante : (i) Nous avons peu de gènes (# 25 000), et ils sont, pour l'essentiel (# 99 %), identiques à ceux du chimpanzé. (ii) L'évolution a été très rapide puisque l'ancêtre que nous partageons avec le chimpanzé aurait vécu il y a approximativement 7 millions d'années, l'espèce humaine étant « vieille »,

pour sa part, d'à peine 200 000 ans, une broutille dans la longue histoire du vivant (3,5 milliards d'années).

La conclusion s'impose. Ce 1 % touche des séquences dont l'importance qualitative est considérable. Ce qui compte le plus dans le développement, dans l'évolution aussi très probablement, ce sont les gènes de développement. Mieux, les changements à l'origine des grandes modifications de phénotype ne sont pas à rechercher uniquement, ni principalement, dans les séquences codantes elles-mêmes, mais dans les éléments régulateurs de l'expression de ces gènes.

À partir de là, la suite du cours a donné lieu à une description des principaux niveaux de régulation qui peuvent expliquer la singularité de *sapiens*. Sans oublier que 1,23 % de différences parmi 2,4 milliards de bases, ça fait 30 millions de nucléotides, tout de même, auxquels il faut ajouter les insertions et délétions (INDEL), non comprises dans ces analyses de mutations, et qui comptent pour 3 % additionnels. Sans compter non plus les gènes qui sont, c'est commun, dupliqués ou perdus. Entre l'homme et le chimpanzé, le nombre de copies diffère de 6,4 %. Ces événements pourraient donc avoir joué un rôle passablement important au cours de l'évolution des primates – et pas d'eux seuls –, plus important en tout cas que les mutations ponctuelles.

Il est impossible d'entrer dans les détails du cours mais il est intéressant de noter que l'ensemble des études récentes associe l'évolution de *sapiens* à celle, rapide, de l'expression de gènes impliqués dans des fonctions aussi diverses que la prolifération cellulaire dans le système nerveux, la morphogenèse des neurones, l'activité synaptique et le métabolisme énergétique. Enfin, nous avons conclu sur certaines mutations ponctuelles dont celle du gène FoxP2 dont des études récentes suggèrent qu'elles sont impliquées dans l'apparition chez *sapiens* et *neanderthalis* des possibilités motrices – au moins celles là – du langage articulé.

#### RÉFÉRENCES PRINCIPALES DU COURS

1. Amadio, J.P. & Walsh, C.A. Brain evolution and uniqueness in the human genome. *Cell* 126, 1033-5 (2006).
2. Arendt, D. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol* 47, 563-71 (2003).
3. Arendt, D. Genes and homology in nervous system evolution: comparing gene functions, expression patterns, and cell type molecular fingerprints. *Theory Biosci* 124, 185-97 (2005).
4. Arendt, D. The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nat Rev Genet* 9, 868-82 (2008).
5. Arendt, D., Denes, A.S., Jekely, G. & Tessmar-Raible, K. The evolution of nervous system centralization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 1523-8 (2008).
6. Arendt, D., Tessmar-Raible, K., Snyman, H., Dorresteijn, A.W. & Wittbrodt, J. Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science* 306, 869-71 (2004).

7. Bennett, M.R. & Hasty, J. Systems biology: genome rewired. *Nature* 452, 824-5 (2008).
8. Berezikov, E., Thummler, F., van Laake, L.W., Kondova, I., Bontrop, R. et al. Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet* 38, 1375-7 (2006).
9. Biemont, C. & Vieira, C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443, 521-4 (2006).
10. Bock, R. & Timmis, J.N. Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays* 30, 556-66 (2008).
11. Bowmaker, J.K. Evolution of vertebrate visual pigments. *Vision Res* 48, 2022-41 (2008).
12. Brunet, I., Di Nardo, A.A., Sonnier, L., Beurdeley, M. & Prochiantz, A. The topological role of homeoproteins in the developing central nervous system. *Trends Neurosci* 30, 260-7 (2007a).
13. Bystron, I., Blakemore, C. & Rakic, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9, 110-22(2008).
14. Canestro, C., Yokoi, H. & Postlethwait, J.H. Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat Rev Genet* 8, 932-42 (2007).
15. Carroll, S.B. Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell* 134, 25-36 (2008).
16. Cohen, J. Evolutionary biology. Relative differences: the myth of 1%. *Science* 316, 1836 (2007a).
17. Cohen, J. Genomics. A little gene xeroxing goes a long way. *Science* 317, 1483 (2007b).
18. Cohen, J. Genomics. Venter's genome sheds new light on human variation. *Science* 317, 1311 (2007c).
19. Conant, G.C. & Wolfe, K.H. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet* 9, 938-50 (2008).
20. Coqueugniot, H., Hublin, J.J., Veillon, F., Houet, F. & Jacob, T. Early brain growth in *Homo erectus* and implications for cognitive ability. *Nature* 431, 299-302 (2004).
21. De Robertis, E.M. Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell* 132, 185-95 (2008).
22. Denes, A.S., Jekely, G., Steinmetz, P.R., Raible, F., Snyman, H. et al. Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* 129, 277-88 (2007).
23. Derelle, R., Lopez, P., Le Guyader, H. & Manuel, M. Homeodomain proteins belong to the ancestral molecular toolkit of eukaryotes. *Evol Dev* 9, 212-9 (2007).
24. Dumas, L., Kim, Y.H., Karimpour-Fard, A., Cox, M., Hopkins, J. et al. Gene copy number variation spanning 60 million years of human and primate evolution. *Genome Res* 17, 1266-77 (2007).
25. Egger, B., Steinke, D., Tarui, H., De Mulder, K., Arendt, D. et al. To be or not to be a flatworm: the acael controversy. *PLoS One* 4, e5502 (2009).
26. Gehring, W.J. New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J Hered* 96, 171-84 (2005).
27. Groszer, M., Keays, D.A., Deacon, R.M., de Bono, J.P., Prasad-Mulcare, S. et al. Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits. *Curr Biol* 18, 354-62 (2008).
28. Haygood, R., Fedrigo, O., Hanson, B., Yokoyama, K.D. & Wray, G.A. Promoter regions of many neural- and nutrition-related genes have experienced positive selection during human evolution. *Nat Genet* 39, 1140-4 (2007).

29. Hill, R.S. & Walsh, C.A. Molecular insights into human brain evolution. *Nature* 437, 64-7 (2005).
30. Hirth, F., Kammermeier, L., Frei, E., Walldorf, U., Noll, M. & Reichert, H. An urbilaterian origin of the tripartite brain: developmental genetic insights from *Drosophila*. *Development* 130, 2365-73 (2003).
31. Iomini, C., Li, L., Mo, W., Dutcher, S.K. & Piperno, G. Two flagellar genes, AGG2 and AGG3, mediate orientation to light in *Chlamydomonas*. *Curr Biol* 16, 1147-53 (2006).
32. Isalan, M., Lemerle, C., Michalodimitrakis, K., Horn, C., Beltrao, P. et al. Evolvability and hierarchy in rewired bacterial gene networks. *Nature* 452, 840-5 (2008).
33. Jeong, S., Rebeiz, M., Andolfatto, P., Werner, T., True, J. & Carroll, S.B. The evolution of gene regulation underlies a morphological difference between two *Drosophila* sister species. *Cell* 132, 783-93 (2008).
34. Khaitovich, P., Enard, W., Lachmann, M. & Paabo, S. Evolution of primate gene expression. *Nat Rev Genet* 7, 693-702 (2006).
35. King, N. The unicellular ancestry of animal development. *Dev Cell* 7, 313-25 (2004).
36. Kitano, H. Biological robustness. *Nat Rev Genet* 5, 826-37 (2004).
37. Kozmik, Z. The role of Pax genes in eye evolution. *Brain Res Bull* 75, 335-9 (2008).
38. Krause, J., Lalueza-Fox, C., Orlando, L., Enard, W., Green, R.E. et al. The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. *Curr Biol* 17, 1908-12 (2007).
39. Kriegstein, A., Noctor, S. & Martinez-Cerdeno, V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci* 7, 883-90 (2006).
40. Krubitzer, L. The magnificent compromise: cortical field evolution in mammals. *Neuron* 56, 201-8 (2007).
41. Lamb, T.D., Collin, S.P. & Pugh, E.N. Jr. Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci* 8, 960-76 (2007).
42. Letinic, K. & Rakic, P. Telencephalic origin of human thalamic GABAergic neurons. *Nat Neurosci* 4, 931-6 (2001).
43. Martin, W. Archaeobacteria (Archaea) and the origin of the eukaryotic nucleus. *Curr Opin Microbiol* 8, 630-7 (2005).
44. McGregor, A.P., Orgogozo, V., Delon, I., Zanet, J., Srinivasan, D.G. et al. Morphological evolution through multiple cis-regulatory mutations at a single gene. *Nature* 448, 587-90 (2007).
45. Mieko Mizutani, C. & Bier, E. EvoD/Vo: the origins of BMP signalling in the neuroectoderm. *Nat Rev Genet* (2008).
46. Moczek, A.P. On the origins of novelty in development and evolution. *Bioessays* 30, 432-47 (2008).
47. Muller, G.B. Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. *Nat Rev Genet* 8, 943-9 (2007).
48. Nilsson, D.E. Eye evolution: a question of genetic promiscuity. *Curr Opin Neurobiol* 14, 407-14 (2004).
49. Nilsson, D.E. & Arendt, D. Eye evolution: the blurry beginning. *Curr Biol* 18, R1096-8 (2008).

50. Oldham, M.C., Horvath, S. & Geschwind, D.H. Conservation and evolution of gene coexpression networks in human and chimpanzee brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17973-8 (2006).
51. Pigliucci, M. Is evolvability evolvable? *Nat Rev Genet* 9, 75-82 (2008).
52. Pollard, K.S., Salama, S.R., Lambert, N., Lambot, M.A., Coppens, S. et al. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* 443, 167-72 (2006).
53. Prabhakar, S., Noonan, J.P., Paabo, S. & Rubin, E.M. Accelerated evolution of conserved noncoding sequences in humans. *Science* 314, 786 (2006).
54. Preuss, T.M., Caceres, M., Oldham, M.C. & Geschwind, D.H. Human brain evolution: insights from microarrays. *Nat Rev Genet* 5, 850-60 (2004).
55. Purcell, E.B. & Crosson, S. Photoregulation in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 11, 168-78 (2008).
56. Ranade, S.S., Yang-Zhou, D., Kong, S.W., McDonald, E.C., Cook, T.A. & Pignoni, F. Analysis of the Otd-dependent transcriptome supports the evolutionary conservation of CRX/OTX/OTD functions in flies and vertebrates. *Dev Biol* 315, 521-34 (2008).
57. Ruiz-Trillo, I., Burger, G., Holland, P.W., King, N., Lang, B.F. et al. The origins of multicellularity: a multi-taxon genome initiative. *Trends Genet* 23, 113-8 (2007).
58. Rutherford, S.L. & Lindquist, S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336-42 (1998).
59. Sharma, A.K., Spudich, J.L., Doolittle, W.F. Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol* 14, 463-9 (2006).
60. Sollars, V., Lu, X., Xiao, L., Wang, X., Garfinkel, M.D. & Ruden, D.M. Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. *Nat Genet* 33, 70-4 (2003).
61. Spudich, J.L. The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol* 14, 480-7 (2006).
62. Stricker, J., Cookson, S., Bennett, M.R., Mather, W.H., Tsimring, L.S. & Hasty, J. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature* 456, 516-9 (2008).
63. Telford, M.J. A single origin of the central nervous system? *Cell* 129, 237-9 (2007).
64. Varki, A., Geschwind, D.H. & Eichler, E.E. Explaining human uniqueness: genome interactions with environment, behaviour and culture. *Nat Rev Genet* 9, 749-63 (2008).
65. Wagner, A. Gene duplications, robustness and evolutionary innovations. *Bioessays* 30, 367-73 (2008).
66. Wrighton, K.H., Lin, X., Feng, X.H. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9244-9 (2008).

### Séminaire

Tenu sous la forme de deux journées d'étude en collaboration avec les chaires d'Anthropologie de la nature le 20 mars 2009 et de Physiologie de la perception et de l'action le 28 avril 2009.

#### Première journée : formes, déformations, transformations

Introduction par Philippe Descola

Arezki Boudaoud, Laboratoire de physique statistique, École normale supérieure : Mécanoperception et géométrie dans la morphogénèse



Philippe Comar, professeur de morphologie à l'École nationale des Beaux-Arts :  
Les grilles de la beauté, de Dürer à D'Arcy Thompson

Jacques Dumais, *Department of organismic and Evolutionary Biology*, Harvard :  
Sur l'émergence de structures cellulaires complexes à partir de règles de division  
simples

Dimitri Karadimas, CNRS, Laboratoire d'anthropologie sociale : Saillances et  
projections de formes dans les animaux imaginaires

Yoël Forterre, IUSTI, Polytech Marseille : Physique des mouvements rapides  
chez les plantes... ou comment bouger sans muscles

Carlo Severi, EHESS et CNRS, Laboratoire d'anthropologie sociale : L'idée, la  
série et la forme: retour sur la Biologie des images

Jean Petitot, EHESS, Centre d'analyse et de mathématique sociales : Modèles  
dynamiques de morphogenèse et théories de la forme

Conclusions par Alain Prochiantz

## **Deuxième journée : cartes cérébrales**

Introduction par Alain Berthoz

Andrew King, Université d'Oxford, *Department of Physiology, Anatomy and  
Genetics*: Using virtual adult ears to investigate the role of acoustical factors and  
experience in auditory space map development

Robert Baker, *New York University*: Evolutionary development of extraocular  
sensory-motor maps

Daniel Bennequin, Université Paris VII, département de mathématiques, et  
LPPA Collège de France : Les géométries du cerveau : l'exemple du système de  
neurones de grilles et du colliculus supérieur

Chantal Milleret, Collège de France et LPPA : Développement des cartes  
visuelles : le problème de leur mise en correspondance

Alexandra Rebsam, INSERM U839 Institut du Fer à Moulin : Nouvelles  
données sur le rôle de l'activité dans la construction des cartes sensorielles

Filippo Rijli, *Neurobiology Friedrich Miescher Institute*, Bâle-Suisse : Contrôle  
génétique de l'homunculus sensoriel

Ariel Di Nardo, Collège de France, CNRS et École normale supérieure : Tracer  
son chemin de l'œil au cortex

Conclusions par Alain Prochiantz

## Recherche

La recherche du laboratoire se divise, avec des recouvrements, entre une partie théorique et fondamentale et une autre plus orientée vers les applications technologiques ou thérapeutiques.

### Partie théorique et fondamentale

#### *Création de patterns*

Nous avons continué d'explorer la signification physiologique du mécanisme de signalisation par transfert intercellulaire de protéines à homéodomaine. Ces études s'appuient sur quatre modèles. Un premier modèle est la formation de bords le long de l'axe DV du tube nerveux aux périodes précoces du développement et la migration des oligodendrocytes. La stratégie est de suivre la façon dont les frontières entre territoires DV peuvent être modifiés quand on bloque le passage intercellulaire de certains facteurs de transcription de la classe des homéoprotéines, en particulier Pax6 et Nkx2.2. Ces études menées en collaboration avec l'équipe de Jean-Léon Thomas à la Salpêtrière démontrent que Pax6 est présent à la surface des cellules et que sa neutralisation extracellulaire modifie le patron d'expression du domaine Olig2 et la migration des précurseurs des oligodendrocytes.

Dans le même ordre d'idée, nous avons confirmé, en collaboration avec Forence Maschat (CNRS, Montpellier), un effet non cellulaire autonome de l'homéoprotéine *Engrailed* dans la formation de la veine transverse antérieure au niveau du disque imaginal de l'aile de drosophile.

#### *Guidage axonal*

Dans une étude antérieure menée en collaboration avec le laboratoire de Christine Holt (Cambridge, UK) nous avons démontré (Brunet et al. *Nature*, **483**, 94-98, 2005) que les cônes de croissance des neurones ganglionnaires de la rétine (RGCs) d'origine nasale et temporale répondent de façon opposée (attraction et répulsion) quand ils sont placés dans un gradient de l'homéoprotéine *Engrailed*. Cette réponse requiert l'internalisation de la protéine par les cônes et repose sur une régulation de la traduction locale des ARN messagers des cônes par l'homéoprotéine, sans implication de la transcription.

Cette année, nous avons démontré que ce phénomène existe aussi *in vivo* (modèles xénope et poulet) et identifié la nature de certains messagers traduits.

La partie *in vivo* implique une collaboration avec Andrea Wizenmann et Wolfgang Wurst (Tübingen et Munich, Allemagne), et Christine Holt (Cambridge, UK). Ce travail est sous presse dans la revue *Neuron*. Dans ce manuscrit, nous démontrons sans ambiguïté les faits suivants :

1. *Engrailed* (En1 et En2) est exprimé à la surface du tectum selon un gradient antéro-postérieur. La quantité de protéine à la surface correspond à 5 % de son contenu nucléaire.

2. La neutralisation de la protéine extracellulaire *in vivo* entraîne une projection ectopique des neurones temporaux dans les domaines postérieurs du tectum.

3. Cette activité d'*Engrailed* se fait en coopération avec les Ephrins, l'EphrinA5 en particulier.

Nous pouvons donc conclure que le transfert *in vivo* de l'homéoprotéine *Engrailed* est nécessaire au *patterning* des projections de la rétine sur le tectum.

Pour ce qui est de la caractérisation des messagers traduits, nous avons utilisé une approche par puces à ADN en comparant dans diverses situations (*Engrailed* internalisé ou non) le population des messagers en cours de traduction. Parmi les candidats nous avons eu la surprise de trouver des messagers mitochondriaux et nous avons, à partir de cette observation, démontré que l'internalisation d'*Engrailed* augmente l'activité du complexe I et la synthèse d'ATP. Cet ATP sécrété est dégradé en Adénosine qui stimule les récepteurs purinergiques de type A1. Ce travail sera prochainement soumis pour publication.

#### *Période critique*

Dans ce travail (collaboration avec Takao Hensch, Harvard Medical School, Boston, USA), nous avons démontré que la capture de l'homéoprotéine *Otx2* par les interneurones GABAergiques à parvalbumine (couches 3 et 4 du cortex visuel binoculaire) ouvre la période critique (plasticité corticale) au cours de la maturation post-natale du système visuel. Ce travail fondé sur des pertes et gain de fonction d'*Otx2* et des enregistrements électrophysiologiques a été publié cette année (Sugiyama et al., *Cell*, **134**, 508-520, 2008).

Au cours de cette étude, nous avons observé qu'*Otx2* infusé dans le cortex est spécifiquement internalisé par les neurones GABA à parvalbumine, suggérant un mécanisme de reconnaissance spécifique. Nous avons accumulé des données qui soutiennent l'hypothèse de l'existence de sites de fixation constitués par des sucres complexes (glycosaminoglycans) et identifié dans la séquence d'*Otx2* un domaine de 12 acides aminés responsable de cette reconnaissance. Nous avons infusé ce peptide, et démontré qu'il bloque le passage d'*Otx2* endogène dans les interneurones PV et rouvre ainsi une période de plasticité dans le cortex visuel binoculaire (manuscrit en préparation). Nous avons commencé l'identification des cibles transcriptionnelles et traductionnelles d'*Otx2* dans les neurones GABA à parvalbumine.

### **Études technologiques et applications thérapeutiques**

#### *Glaucome*

Le glaucome est provoqué par la mort des cellules ganglionnaires rétiniennes (RGCs). Les causes de cette mort ne sont pas établies avec certitude, même si l'idée prédominante implique une augmentation anormale de la pression intraoculaire. Nous avons formé l'hypothèse d'un contrôle de la survie des RGCs par le passage

de la protéine Otx2 entre les cellules bipolaires et les RGCs. Dans le cadre d'un contrat industriel avec Fovea-SA, nous avons mis au point des modèles *in vitro* et *in vivo* permettant de tester les propriétés protectrices d'Otx2 sur la mort des RGCs adultes. Nos résultats démontrent qu'Otx2 internalisé par les RGCs protège ces neurones contre une mort induite soit par l'axotomie (*in vitro*) soit par une neurotoxicité glutamatergique (*in vivo*). Les résultats sur le rôle d'Otx2 comme protéine thérapeutique ont donné lieu à deux dépôts de brevet.

### *Maladie de Parkinson*

L'homéoprotéine Engrailed (En1 et En2) est exprimée, chez l'adulte, dans les noyaux dopaminergiques (DA) du mésencéphale, qui dégènèrent dans la maladie de Parkinson. Au cours d'un travail publié en 2007 (Sonnier et al., *J. Neurosci.*, **27**, 1063-1071, 2007), nous avons rapporté que la délétion d'un seul allèle *En1* (donc un allèle *Engrailed* sur quatre) s'accompagne d'une mort progressive des neurones DA chez l'adulte. Cette observation et d'autres raisons, que je ne développe pas, nous ont conduits à proposer qu'*Engrailed* pouvait se trouver dans le circuit génétique de la maladie de Parkinson. Depuis nous avons démontré qu'*Engrailed* internalisé par les neurones DA protège *in vitro* et *in vivo* contre leur mort spontanée, mais aussi induite par le MPP+, une drogue qui s'attaque au complexe I mitochondrial. Nous avons identifié des cibles transcriptionnelles et traductionnelles d'*Engrailed* 1. Parmi les cibles traductionnelles, on retrouve des messagers encodant des protéines du complexe I, en particulier NdufS1 et NdufS3. Nous avons démontré que l'internalisation d'*Engrailed* 1 augmente le métabolisme énergétique des neurones mésencéphaliques ventraux et que le mutant *En1*+/- montre une baisse de l'expression de NdufS1 et NdufS3 spécifiquement dans les neurones dopaminergiques. Un manuscrit a été soumis pour publication.

### **Autres travaux**

La chaire abrite deux équipes, une équipe indépendante dirigée par Alain Joliot, et une autre en cours d'autonomisation dirigée par Sophie Vríz. L'équipe de Sophie Vríz vient d'arriver et développe le modèle du poisson zèbre pour étudier le rôle du transfert des homéoprotéines dans le développement et la régénération. L'équipe d'Alain Joliot continue ses travaux sur les mécanismes de sécrétion et d'internalisation des homéoprotéines et développe les applications technologiques de cette propriété de transfert intercellulaire.

## **Publications**

### **Articles**

1. Aubry, S., Burlina, F., Dupont, E., Delaroche, D., Joliot, A., et al. Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides. *FASEB J* (2009).

2. Aussedat, B., Dupont, E., Sagan, S., Joliot, A., Lavielle, S. et al. Modifications in the chemical structure of Trojan carriers: impact on cargo delivery. *Chem Commun (Camb)*, 1398-400 (2008).
3. Bouzaffour, M., Dufourcq, P., Lecaudey, V., Haas, P. & Vriza, S. Fgf and Sdf-1 pathways interact during zebrafish fin regeneration. *PLoS One* 4, e5824 (2009).
4. Ceballos-Picot, I., Mockel, L., Potier, M.C., Dauphinot, L., Shirley, T.L. et al. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 18, 2317-27 (2009).
5. Encalada, S.E., Moya, K.L., Lehmann, S. & Zahn, R. The role of the prion protein in the molecular basis for synaptic plasticity and nervous system development. *J Mol Neurosci* 34, 9-15 (2008).
6. Gitton, Y., Tibaldi, L., Dupont, E., Levi, G. & Joliot, A. Efficient CPP-mediated Cre protein delivery to developing and adult CNS tissues. *BMC Biotechnol* 9, 40 (2009).
7. Rampon, C., Bouillot, S., Climescu-Haulica, A., Prandini, M.H., Cand, F. et al. Protocadherin 12 deficiency alters morphogenesis and transcriptional profile of the placenta. *Physiol Genomics* 34, 193-204 (2008a).
8. Rampon, C., Weiss, N., Deboux, C., Chaverot, N., Miller, F. et al. Molecular mechanism of systemic delivery of neural precursor cells to the brain: assembly of brain endothelial apical cups and control of transmigration by CD44. *Stem Cells* 26, 1673-82 (2008b).
9. Sugiyama, S., Di Nardo, A.A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M. et al. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134, 508-20 (2008).
10. Wizenmann, A., Brunet, I., Lam, J., Sonnier, L., Beurdeley, M. et al. Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron*, in press.

## Brevets

1. Prochiantz, A. & Moya, K. Utilisation d'une Homéoprotéine de la famille Bicoïd pour le traitement du Glaucome. 9 janvier 2008, n° FR 08/00110.
2. Prochiantz, A., Beurdeley, M. & Di Nardo, A. Polypeptides d'adressage spécifique à des cellulés cibles d'Otx2. 19 janvier 2009, n° FR 09/00217.

## *Participation in meetings 2008-2009*

Brain Diseases and Molecular machines. March 25-28, 2008. Paris, France. Keynote lecture.

Visual System Development Gordon Conference. August 10-15 2008. Newport Rhode Island, USA.

The Science of Re-assessing and Remaking Human/non-human Species Boundary. August 25-27, 2008. Heidelberg, Germany.

The Cell-Penetrating Peptides (CPP) Satellite Meeting. August 30-31, 2008. Helsinki, Finland. Keynote lecture.

Chemistry and Biology Symposium of the Japan Society of Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry. September 27 2008. Nagoya, Japan. Keynote lecture.

Neurocultures workshop. February 20-22, 2009. Berlin, Germany

International Conference on Innovative Research in Autism. April 15-17, 2009. Tours, France. Keynote lecture.