

Processus morphogénétiques

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

COURS : MALADIES NEUROLOGIQUES ET PSYCHIATRIQUES,
UN ÉCLAIRAGE DÉVELOPPEMENTAL

Introduction

Cette année le cours est consacré à l'examen de ce qu'une perspective évolutive et développementale peut apporter à notre compréhension de l'étiologie des maladies psychiatriques et neurologiques. Pour le développement, on comprend facilement son intérêt, puisque toute erreur un peu excessive dans le processus de fabrication du cerveau aura forcément des conséquences en pathologie.

Cette évidence laisse ouverte la question des parts respectives et interactions du génétique et de l'épigénétique, l'épigénétique étant défini comme les modifications réversibles ou irréversibles des structures biologiques en réponse à des changements de l'environnement. Ces modifications s'inscrivent dans une marge de fluctuation autorisée à l'intérieur de laquelle l'animal humain reste « normal ».

Pour l'évolution, la question est plus compliquée. De nombreux chercheurs considèrent que plusieurs maladies psychiatriques et neurologiques sont spécifiquement humaines. On s'interrogera alors sur les différences (génétiques, développementales, épigénétiques, anatomiques, physiologiques, sociales) entre *Homo sapiens* et *Pan troglodytes* (bonobo), notre plus proche cousin aujourd'hui vivant. En espérant qu'elles apportent des clés sur ce « propre de l'homme ». Il se peut aussi que certaines de ces pathologies ne soient pas spécifiquement humaines mais apparaissent chez l'humain du fait de l'allongement de la durée moyenne de son existence. C'est peut-être le cas de maladies qui, même si elles sont génétiques (Huntington, certaines formes de Parkinson et d'Alzheimer), ne se révèlent qu'une fois passée la quarantaine. Ce ne l'est pas pour d'autres maladies qui se révèlent dans les toutes premières années de la vie, l'autisme par exemple, ou autour de la période pré-pubertaire, comme les schizophrénies.

Supposons que certaines maladies psychiatriques soient liées à une neurogenèse défectueuse ou à un retard dans le déclenchement d'une période critique de maturation d'une classe d'interneurones inhibiteurs. Les souris ayant un cortex et

des neurones inhibiteurs, il nous faudra alors analyser ce que la neurogenèse a de spécial chez *sapiens*, la structure particulière de son cortex, le nombre élevé de neurones inhibiteurs dans des régions du cortex qui n'existent pas (ou à peine) chez la souris. Bref, il faudra croiser la réalité de l'évolution à celle du développement et accepter qu'une période critique du développement d'un système que nous partageons avec la souris, le système visuel par exemple, soit un modèle pour toutes les périodes critiques, et de ce fait une façon d'étudier l'étiologie de certaines formes de schizophrénie, mais, évidemment pas un modèle animal de schizophrénie.

On peut alors entrevoir une possibilité d'utiliser ces modèles pour définir des stratégies pharmacologiques ou génétiques qui pourraient s'appliquer chez *sapiens*. Ce qui nous rappelle que l'approche Evo/Devo, voire Evo/Eco/Devo (pour tenir compte de l'environnement), n'est pas orthogonale aux approches génétiques consistant à partir de familles pour repérer des gènes de susceptibilité aux maladies de l'esprit. Car même si certaines formes de ces maladies sont génétiques (des mutations ont été identifiées), la majorité des formes sont sporadiques (d'étiologie inconnue, ce qui n'exclut pas une composante génétique). Les formes génétiques avérées ont l'avantage d'offrir une entrée dans la physiologie par des expériences de perte et gain de fonction chez la souris (recherche de tous les gènes co-régulés et des phénotypes associés aux perte/gain de fonction de ces gènes), ce qui veut dire créer des modèles animaux, imparfaits mais nécessaire pour passer de la génétique à la physiologie et identifier de nouvelles voies thérapeutiques.

Les aires corticales et compartiments

C'est une des réalités de la construction du cortex que la contradiction entre homogénéité architectonique et compartimentation génétique et fonctionnelle. Cette homogénéité de la structure corticale est d'un grand intérêt physiologique, évolutif et développemental. Si les différentes aires sont anatomiquement semblables, comment se spécialisent-elles au cours du développement ? Et pour ce qui est de l'évolution, cette identité est évidemment favorable à des modifications du nombre des aires et de la position des bords (extension d'une aire aux dépens d'une autre avoisinante).

On doit même accepter qu'au sein d'une même espèce, la taille des aires dévolues à une même fonction soit variable. Soit génétiquement, soit du fait de la stochastique du développement, soit comme effet épigénétique de l'activité, il existe une grande variabilité interindividuelle pour la surface de certaines aires corticales. Mais la surface totale du cortex étant peu ou prou la même, l'augmentation de la taille d'une aire se fait nécessairement au détriment de celle d'une aire avoisinante, et le déplacement d'un bord peut se traduire en anomalie pathologique si le changement excède certaines limites.

Sur le plan évolutif, en comparaison avec un chimpanzé, nous avons environ quatre fois plus de substance cérébrale que nécessaire si on applique la loi de la proportionnalité entre taille du corps et poids du cerveau chez les primates. Mais à l'intérieur de cette augmentation générale, nous avons perdu de la surface, relativement, pour certaines aires, comme les aires visuelles ou olfactives, et en avons gagné pour d'autres comme les aires du cortex préfrontal ou du langage. Ces changements peuvent reposer sur une régulation différente de la mort et de la prolifération cellulaires pour chaque aire, mais peuvent aussi traduire un déplacement de frontières entre les aires.

Pour la formation des bords, donc la définition des surfaces consacrées aux différentes aires, nous avons enrichi le modèle des gradients de morphogènes de l'hypothèse de l'action paracrine des facteurs de transcription de la classe des homéoprotéines (HP) agissant comme des morphogènes au sens de Turing. Au-delà, il faut insister sur le fait que les régions qui jouxtent les bords sont souvent des niches pour cellules souches. Par conséquent, bouger un bord c'est augmenter (d'un côté) et réduire (de l'autre) une niche neurogénique.

Un exemple intéressant est fourni par la frontière entre mésencéphale et métencéphale. De part et d'autre de ce bord *Otx2/Gbx2* (deux HP) se trouvent des niches qui permettent le développement des noyaux dopaminergiques (du côté *Otx2*) et sérotoninergiques (du côté *Gbx2*). Ces neurones sont impliqués dans la régulation de l'humeur et les récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques ainsi que les systèmes de recapture de ces amines cérébrales sont des cibles pharmacologiques importantes pour plusieurs maladies neurologiques ou psychiatriques. Chacun connaît le Prozac, inhibiteur de recapture de la 5HT, et les neuroleptiques classiques qui agissent sur les systèmes dopaminergiques (récepteurs D2).

La perte de fonction d'*Otx2* se traduit par une avancée de *Gbx2* et un gain de fonction d'*Otx2* par un recul de *Gbx2*. Dans le premier cas, on diminue la niche DA en faveur de la niche 5HT, et dans le deuxième on augmente la niche DA aux dépens de la niche 5HT. Les animaux sont alors viables mais leur comportement est affecté. Par exemple, l'excès de neurones dopaminergiques dans le gain de fonction *Otx2* induit un phénotype comportemental « agité ». Ces manipulations permettent donc de développer des modèles animaux de troubles du comportement.

Les patrons d'expression des morphogènes se maintiennent parfois chez l'adulte. De ce fait, ils revêtent une réelle importance physiologique. Des modifications épigénétiques de la chromatine sont rendues nécessaires pour que les cellules mémorisent leur position, y compris au sein d'un gradient (l'enjeu n'est pas que je doive ou non synthétiser telle protéine, mais combien je dois en synthétiser du fait de ma position) et conservent cette information au fil des divisions, migrations et autres déformations.

Le développement du télencéphale et sa segmentation dorso-ventrale

Au début de son développement, la plaque neurale antérieure donne le prosencéphale qui se divisera en télencéphale et diencéphale. Chez la souris, le télencéphale est « établi » au 8^e jour de la gestation (E8,5) stade où il est composé d'une seule couche de cellules exprimant le facteur de transcription *Foxg1*. Les choses se compliquent rapidement avec l'expression de nombreux gènes de développement. Une étape importante est la division du télencéphale en une partie dorsale (*pallium*) et une partie ventrale (*sub-pallium*).

Le *pallium* génère des neurones glutamatergiques excitateurs, le plus souvent à longue projection, qui cohabitent avec des neurones inhibiteurs GABAergiques, ceux-ci exerçant un contrôle inhibiteur sur ceux-là. Un dérèglement de cette balance inhibition/excitation au niveau du cortex pourrait être à l'origine de maladies psychiatriques. C'est d'autant plus intéressant que les primates, *sapiens* au plus haut degré, se caractérisent par une augmentation du nombre des neurones inhibiteurs. Les neurones glutamate et GABA constituent l'essentiel des neurones du cerveau, et leur activité est régulée par les neurones aminergiques. Les peptides aussi jouent leur partition.

Le télencéphale dorsal se divise en deux sous-domaines : un domaine antérieur et latéral, et un domaine postérieur et médian respectivement marqués par les expressions complémentaires de Pax6 et Emx2. Le domaine Pax6 se différenciera en néocortex et le domaine Emx2 en hippocampe, ourlet cortical et plexus choroïde. Le néocortex nous est familier. Nous avons longuement parlé de l'hippocampe l'année dernière comme site d'une neurogenèse adulte et pour son rôle de voie d'entrée des informations qui seront stabilisées – ou non – au niveau du cortex. Le plexus choroïde est une source de morphogènes sous-estimée et nous-mêmes travaillons sur la sécrétion d'Otx2 par le plexus et son rôle dans la maturation des neurones GABAergiques à parvalbumine (PV). Cette source inattendue d'un facteur de transcription voyageur régule la maturation de l'inhibition corticale au cours des périodes critiques du développement cérébral et dans le maintien de cette inhibition tout au long de l'existence, ce qui n'est pas sans rapport avec les états pathologiques qui nous intéressent.

Le télencéphale ventral se divise en un domaine médian qui donne la MGE (éminence ganglionnaire médiane) et un domaine latéral postérieur qui donne les LGE et CGE (éminences ganglionnaires latérale et caudale). Ces régions ventrales fournissent des neurones des ganglions de la base et des aires limbiques respectivement impliquées dans la régulation de la motricité et des états affectifs. Les neurones GABA générés par ces trois structures (MGE, LGE, CGE) ne se développent pas uniquement localement. Une part d'entre eux migre pour peupler le cortex et le bulbe olfactif. La MGE fournit les neurones GABA à somatostatine et PV, ainsi que les neurones NPY du cortex. La CGE fournit les neurones calretinine et VIP, une autre famille de neurones inhibiteurs corticaux. La LGE fournit essentiellement les interneurones du bulbe olfactif. Ces structures ventrales sont donc la source principale des neurones inhibiteurs chez les muridés. Les choses changent chez l'homme qui, en plus de ces neurones qui viennent du cortex ventral, ont aussi des neurones GABA d'origine dorsale, point important pour notre réflexion sur les désordres cognitifs.

À ce stade, une première source possible de ces désordres est l'accumulation de petites erreurs qui conduiraient à un mauvais positionnement des bords et à une modification du nombre de neurones de projection, comme les neurones DA ou 5HT) et d'interneurones GABA dans les ganglions de la base (sub-pallium) et le cortex (pallium). Ces populations cellulaires jouent en effet des rôles importants dans la mise en place et la régulation de circuits impliqués dans les maladies neurologiques et psychiatriques.

Evo/Devo du cortex

Le néocortex est la dernière innovation évolutive pour le système nerveux central. Son origine remonte aux reptiles (carbonifère), mais c'est chez les mammifères qu'il apparaît comme une structure à 6 couches (transition Triasique à Jurassique, il y a 200 millions d'années). La taille et la complexité de ce néocortex sont à leur apogée dans notre espèce, qui s'est séparée des rongeurs il y a 90 à 100 millions d'années et des singes de l'ancien monde il y a 25 millions d'années.

Le néocortex est une couche multicellulaire composée de neurones de projection (les neurones pyramidaux générés sur place par le pallium) et de neurones locaux, ou interneurones, générés par le sub-pallium et qui migrent vers le néocortex. Ces

cellules sont arrangées en couches horizontales, et interconnectées dans la dimension verticale. Cette uniformité cytoarchitecturale est modulée par une variabilité qui dépend de la fonction de l'aire corticale concernée. À ces types cellulaires il faut ajouter les cellules gliales (macrophages compris) et les cellules des vaisseaux sanguins.

Les neurones glutamatergiques excitateurs sont générés dans les zones ventriculaires ou subventriculaires (VZ ou SVZ) à partir desquelles ils migrent le long des glias radiaires (RG). Les RG ne sont pas seulement des guides pour la migration. Elles sont aussi des cellules souches qui se divisent pour donner deux glias radiaires, ou une glie radiaire et un précurseur intermédiaire (IP), compartiment d'amplification de la SVZ pour la production de neurones.

Chez les souris, la grande majorité des RG sont des cellules épithéliales de la VZ. Dans d'autres espèces, singe et homme en particulier, on trouve des cellules de type RG dans la SVZ qui a une épaisseur considérable et se divise en zones interne et externe (ISVZ et OSVZ). L'OSVZ est la source de la plupart des neurones. Cette OSVZ est hétérogène, contenant à la fois des RG et des IP.

Évolution des génomes, unicité de *sapiens*

Cette partie examine l'importance qualitative des différences génétiques entre les chimpanzés et nous. Ces différences ne signifient pas que *sapiens* serait plus évolué que *Pan*, mais que les deux espèces sont les produits d'évolutions divergentes depuis 7 à 10 millions d'années. Chez les primates, la taille du cerveau est approximativement proportionnelle à celle du corps. De ce point de vue, notre cerveau présente un excès de 900 cm³, qui agrandissent les régions « cognitives » et imposent un lourd tribut connexionniste et énergétique.

Devant la grande différence phénotypique et culturelle entre l'homme et le chimpanzé, il faut s'interroger sur la réalité du 1,23 % de différence génétique et la non linéarité entre les changements génétiques et phénotypiques. Tout d'abord, tous les gènes ne sont pas égaux et modifier l'expression d'un gène de développement aura des conséquences autrement importantes que s'il s'agissait d'un gène codant pour la forme du poil. Ensuite, des mutations (par exemple modifiant la structure de la chromatine) peuvent avoir des effets sur l'expression d'un grand ensemble de gènes. D'où l'impossibilité de tracer une relation de proportionnalité entre un pourcentage de mutations et une différence de phénotype.

Cela est vrai des mutations ponctuelles dans les séquences codantes mais aussi dans des séquences non codantes. Les 25 000 gènes encodant des protéines comptent pour seulement 2 % du génome et les 98 % autres sont constitués de séquences régulatrices. D'ailleurs, on ne peut plus dire que les séquences régulatrices sont non codantes, beaucoup d'entre elles codent pour des ARN régulateurs. Parmi ceux-ci, les *µ*RNA régulent la traduction (principalement), les « *long non coding RNAs* » ou lncRNA régulent la transcription et induisent des changements épigénétiques : méthylation de l'ADN et des histones, recrutement des complexes Polycomb (inhibition) et Trithorax (activation). Enfin, les transposons, tout particulièrement LINEs et SINEs ont des fonctions régulatrices directes au niveau de la méthylation de l'ADN et de la traduction. S'ils sont retranscrits en ADN et insérés dans le génome, ils ont des effets mutagènes permanents.

Arrêtons-nous un instant : hier nous avions 98 % d'ADN poubelle qui ne servaient soi-disant à rien. Puis nous avons eu 98 % de séquences non codantes et 2 % de séquences codantes avec l'idée que les séquences non codantes étaient des régions promotrices ou des introns sur lesquels des facteurs venaient se fixer pour réguler la transcription. Et aujourd'hui, nous découvrons qu'une part importante de ces séquences non codantes sont en fait codantes mais qu'elles ne codent pas pour des protéines mais pour des ARN dont les fonctions régulatrices s'exercent au niveau de la transcription, de la traduction, de l'évolution des génomes, et peut-être à d'autres niveaux qu'il nous reste à découvrir.

Mutations ponctuelles

FoxP2 est devenu le modèle de mutations ponctuelles aux conséquences évolutives importantes. L'étude génétique de familles transmettant un déficit linguistique a conduit à identifier une mutation dans la séquence codante du facteur de transcription FoxP2. Ce gène est présent chez tous les vertébrés et l'homme et le chimpanzé diffèrent par deux substitutions non synonymes apparues il y a moins de 200 000 ans. Cette version humaine du gène influence le développement et la fonction de régions cérébrales associées à l'apprentissage et à la production de séquences linguistiques. Ces fonctions incluent le contrôle des tâches motrices délicates nécessaires au langage articulé. Les mutations « *sapiens* » pourraient expliquer l'exceptionnelle fluidité linguistique de notre espèce.

Le langage est une caractéristique centrale de *sapiens*. Par-delà son aspect cognitif, le langage articulé nécessite une vocalisation complexe dont une composante est anatomique (comme la position basse du larynx) l'autre neurologique (projection des motoneurones corticaux sur les motoneurones du larynx). De fait, les mutations de *FOXP2* affectent la coordination des mouvements oro-faciaux et l'apprentissage auditif. Les données physiologiques suggèrent une altération des circuits cortico-striataux et cortico-cérébelleux. Il est difficile de savoir si les déficits grammaticaux sont liés à des problèmes moteurs ou aux modifications des circuits neuronaux, dont ceux impliqués dans l'apprentissage auditif.

FOXP2 est exprimé dans les neurones pyramidaux des couches V et VI du cortex, dans les neurones de divers noyaux thalamiques, dans les cellules de Purkinje du cervelet, dans les « *medium spiny neurons* » du striatum et dans les interneurons V1 de la moelle épinière. Son expression augmente dans le thalamus auditif des souris après stimulation auditive, suggérant une activation dépendante de l'activité y compris dans des neurones différenciés.

Chez les vertébrés, FoxP2 est parmi les 5 % des protéines les plus conservées. Deux changements se sont produits après notre séparation d'avec les chimpanzés. L'idéal serait d'exprimer une forme humaine chez le chimpanzé, mais c'est peu envisageable. D'où le pis-aller murin consistant à remplacer le gène murin par sa forme humaine. Ces souris « humanisées » présentent quelques modifications sans gravité. Des études d'association entre maladies de l'esprit et des mutations de *FoxP2* ou des modifications des *patterns* de méthylation des CpG n'ont donné des résultats que moyennement convaincants en faveur de cette hypothèse.

À l'inverse, on peut se demander si une difficulté d'ordre linguistique, ou auditive, peut – sur un fond génétique donné – avoir des répercussions d'ordre psychiatrique. Cette démarche ne s'est pas montrée conclusive. D'où l'embarras : indépendamment

du fait que l'on ne peut exclure un lien entre *FoxP2* et maladies psychiatriques, il semble assez certain que ce lien, s'il existe, n'est pas direct et est sans doute complexe. *FoxP2* avait été choisi pour son lien avec le langage humain et la vitesse de son évolution dans notre lignage. Ce qui signifie que le critère « a évolué rapidement dans la lignée humaine » n'est pas suffisant pour faire d'un gène, fût-il lié à une fonction cognitive humaine, un candidat sérieux. Pour en apporter la « preuve », je me tournerais vers cette approche qui consiste à rechercher des éléments génétiques qui ont évolué rapidement chez *sapiens*.

Évolution accélérée chez l'humain et ARN régulateurs

Pollard et ses collègues ont recherché les séquences les plus conservées au cours de l'évolution et ayant subi une forte accélération évolutive entre nous et le chimpanzé. Le plus « accéléré » de ces gènes HAR1 (*Human accelerated Region 1*) est un nouvel ARN impliqué dans le développement du cortex humain. Il présente le long de notre lignage 18 substitutions antérieures à 1 million d'années (fin d'*Homo erectus*, le premier à passer la barre des 1000 cm³ de cerveau). HAR1F apparaît entre les semaines 7 et 9 de la gestation au niveau du télencéphale dorsal dans les neurones Cajal-Retzus qui sécrètent la Reelin, une molécule impliquée dans la migration radiaire. À 24 semaines de gestation, HAR1F est exprimé aussi dans le gyrus denté, le cortex cérébelleux et quelques noyaux du cerveau postérieur. L'excitation possible vient du fait que *Reelin* est, parmi d'autres, un gène de sensibilité aux maladies psychiatriques. Dans un article publié le mois suivant, les mêmes auteurs s'intéressent à 202 HARs.

On se demande alors ce que peut-être la fonction de tels gènes. Pour HAR1, il faudra attendre 2010 pour avoir un premier élément de réponse qui ne concerne pas une maladie psychiatrique, mais une maladie neurologique, la maladie de Huntington.

HAR1 ouvre le chapitre des ARN régulateurs. Je ne reviens pas sur les μ ARN et je reviens aux *long non coding RNAs* (ncRNA ou lncRNA). Nombre de ces ARNnc sont exprimés dans le cerveau et au cours du développement. Généralement, ils régulent l'expression de gènes « classiques » avoisinants. Cette régulation se fait en *cis*, mais aussi en *trans* (transvection) et selon trois modalités essentielles : modification de la chromatine, régulation de la transcription et régulation post-transcriptionnelle.

Pour les modifications de la chromatine, les lncRNA peuvent réguler des modifications épigénétiques, par exemple en recrutant des complexes répressifs. Le recrutement de *polycomb chromatin remodelling complex* PCR2 par HOTAIR (*Hox transcript antisense RNA*) qui prend son origine sur le complexe HoxC et inactive 40kb du locus HoxD) est un bon exemple d'un effet épigénétique. L'inactivation du chromosome X par Xist est un autre classique. Un ARN non codant interne au locus du locus Xist (RepA) recrute PCR2 et rend un des deux X silencieux.

Pour la régulation de la transcription, plusieurs mécanismes sont impliqués. Par exemple, une liaison avec un facteur de transcription ou la formation d'une triple hélice. Pour la régulation post-transcriptionnelle : épissage, édition, transport et dégradation des mRNA sont au travail. De *large intergenic non coding* (linc)RNAs ont été identifiés qui sont exprimés au même niveau que les gènes encodant des protéines. On estime à 4500 le nombre de lincRNAs.

Pour être « complet », rappelons que PIWI, une *RNA-binding protein* et le complexe piRNA/PIWI sont impliqués dans la structuration de la chromatine. D'une part, PIWI interagit avec HP1a (*heterochromatin protein 1a*), ce qui régule la méthylation des histones. D'autre part, la répression épigénétique des retrotransposons implique l'adressage spécifique de DNA méthyltransférases par des complexes PIWI-piRNA. Enfin, des siRNA peuvent catalyser la méthylation de promoteurs et l'extinction de l'expression des gènes concernés.

L'hypothèse d'un monde ARN qui aurait conféré le stockage de l'information au substrat plus stable qu'est l'ADN et les fonctions catalytiques aux protéines participe du dogme central de la biologie moléculaire. Les découvertes récentes changent cette vision et démontrent que le monde des ARN a continué d'évoluer. Sur le plan quantitatif, le nombre de transcrits non codants est au minimum 4 fois supérieur au nombre des transcrits encodant des protéines. Par ailleurs, l'organisation même du génome est très complexe, avec des mélanges de séquences codantes et non codantes sens et anti-sens. Même si on peut s'essayer à classer les ncRNAs entre introniques, sens, anti-sens, proches ou éloignés d'une séquence codante, nombre de ces transcrits échappent aux classifications.

Je prolongerai cette partie par le *RNA editing*, le plus souvent le remplacement d'une Adénosine par une Inosine (A->I) au moyen d'une adénosine déaminase (ADAR). Le *RNA editing* est très actif dans le système nerveux où il modifie les transcrits encodant des canaux ioniques et certains récepteurs. Ce phénomène d'édition, universel, s'est accéléré chez les vertébrés et ce sont les humains qui ont le plus grand nombre de transcrits édités.

Outre les ARN messagers, l'*editing* concerne les μ RNA et les ncRNA. Des mutations de ADAR chez *C. elegans*, la Drosophile ou la souris altèrent les capacités cognitives et prédisposent à la neurodégénération. L'édition A-I est beaucoup plus importante chez les humains que chez la souris et 90 % de cette augmentation affectent les séquences Alu. Les éléments Alu (sous-classe des SINES) ont envahi le génome en 3 phases au cours de l'évolution des primates avec une expansion massive chez les hominidés (1 M de copies, 10,5 % du génome humain). L'analyse des RNA édités montre une forte proportion de gènes « morphogénétiques », ce qui veut dire qu'il peut y avoir à ce niveau une forte variation interindividuelle.

Des transcrits codant pour des enzymes de « surveillance » de l'ADN et de sa réparation sont soumis à édition. Plus largement, on peut supposer que certains ARN édités capturent les activités endonucléase et RT des LINEs et s'insèrent dans le génome. Si tel est le cas, des éditions au niveau des terminaisons pourraient être pérennisées dans le génome, doublant la mémorisation à court terme (par traduction locale de messagers édités) d'une consolidation génomique.

Insertions et délétions, réseaux de gènes

Penchons-nous maintenant sur la question des délétions au fort impact évolutif. On s'appuiera sur l'identification de délétions, chez *sapiens*, de séquences conservées entre les chimpanzés et les autres mammifères. Ces régions très CONservées mais DELétées chez *sapiens* (hCONDELs) sont au nombre de 510. Les hCONDELs couvrent environ 4 Mb du génome de chimpanzé (0,14 %) et ont une taille moyenne de 2804 bp. À l'exception d'un d'entre eux, les hCONDELs validés correspondent à des régions non codantes (355 intergéniques et

154 introniques). Leur localisation démontre un biais de proximité avec des gènes à activité neurale ou impliqués dans la signalisation par hormones stéroïdes.

Pour le cerveau, les hCONDELs sont enrichis au voisinage de gènes exprimés au cours du développement du cortex, notamment dans des régions encodant des gènes suppresseurs de la prolifération et de la migration. Une délétion de 3182 pb, proche d'un gène suppresseur de tumeurs GADD45G a été analysée. La version murine, comme la version chimpanzé, induit l'expression à E14,5 d'un gène rapporteur dans le télencéphale ventral (origine des interneurons GABA) et le diencephale (thalamus). Le promoteur de chimpanzé est aussi actif dans des progéniteurs neurales humains. Cette expression dans les zones subventriculaires a pu accompagner le développement « excessif » du cortex humain (GADD45G est un répresseur du cycle cellulaire et peut activer l'apoptose).

Loin du concept de « gène maître », nombre de gènes fonctionnent en réseaux et sont co-régulés. Dans ces réseaux, la dérégulation d'un des gènes est « tamponnée » par les réactions des autres gènes qui ramènent le système dans une zone d'équilibre physiologique. Sur cette base, plusieurs modules co-régulés ont été identifiés dans différentes régions cérébrales chez l'humain et le chimpanzé, certains d'entre eux montrant de claires différences entre les deux espèces.

Dans un article déjà ancien (2006), le groupe de Geschwind est parti de données de *microarray* (différences d'expression entre plusieurs situations). L'analyse portant sur 18 chimpanzés et 18 humains est centrée sur des régions très spécifiques : les aires de Broca (motricité associée au langage), cortex cingulaire antérieur, cortex visuel primaire, cortex préfrontal, noyau caudé et vermis cérébelleux. Sept modules de co-expression ont ainsi été identifiés dans le cerveau humain. Certains sont fortement conservés entre les humains et les chimpanzés, quand d'autres ne le sont pas ou moins. Ces modules correspondent à des sous-divisions anatomiques du cerveau (sauf pour le module « myéline »). On peut donc associer des gènes ayant un lien fort de régulation et distribuer ces modules entre régions du cerveau.

Le niveau de conservation entre espèces est le plus faible dans les réseaux purement corticaux. À l'intérieur d'un même module, la connectivité intramodulaire pour un gène est mesurée par la somme de sa force de connexion avec tous les autres gènes du module. Cette force, pour un même gène, peut être plus forte dans une espèce que dans une autre. Par exemple, *NRG1*, un gène « candidat » dans la schizophrénie, est 126^e chez *sapiens* (connectivité intramodulaire dans le module cortical de 343 gènes) et 332^e chez le chimpanzé. Alors que les deux animaux ont le même niveau d'expression de *NRG1*, cette expression est hautement corrélée ($p > 0,8$) à celle de 64 autres gènes chez *sapiens* et corrélée à aucun autre gène chez le chimpanzé.

De nombreux gènes montrant une forte connectivité intramodulaire sont conservés chez les deux espèces, ce qui reflète les similarités de structure entre les cerveaux. Mais des différences fortes existent entre les réseaux de co-expression, en particulier dans le cortex. Ces modules de co-expression montrent une hiérarchie évolutive de la conservation inter-espèce : matière blanche > cervelet > noyau caudé > noyau caudé + cortex cingulaire antérieur > cortex.

Un module cortical quasiment absent chez les chimpanzés contient un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, dont 11 gènes de la chaîne de transport des électrons (ETC). Les gènes qui ont une forte liaison d'expression corticale avec les gènes ETC chez l'humain, mais pas chez le chimpanzé, englobent des gènes qui contrôlent la distribution et la morphologie des mitochondries, des gènes de la synaptogenèse et de l'ancrage des vésicules et des

gènes de régulation du cytosquelette. On peut en inférer que l'augmentation spectaculaire du pouvoir d'analyse en parallèle des données, liée à l'augmentation de la taille du cortex, a imposé une augmentation parallèle de la demande énergétique. Il faut donc lier les deux paramètres : explosion de la « circuiterie corticale » et demande métabolique.

Métabolisme

Repartons donc de la piste métabolique. Kaithovitch et ses collaborateurs se sont intéressés aux modifications métaboliques dans la schizophrénie et au cours de l'évolution. Leur démarche consiste à partir des troubles cognitifs et d'identifier des phénomènes qu'on étudiera chez des organismes moins évolués.

En partant de l'hypothèse de la schizophrénie comme maladie proprement humaine, les auteurs ont taché d'identifier des changements évolutifs (sélection positive le long de notre lignage) et de les comparer aux changements moléculaires qui accompagnent la schizophrénie. Sur ce principe, ils ont rassemblé un grand nombre de données publiées (méta-analyse). 16,815 gènes exprimés dans le cerveau ont été ordonnés à partir de 105 individus avec la conclusion que 6 parmi 22 processus sélectionnés positivement dans notre lignage sont enrichis de façon significative parmi les gènes exprimés différenciellement dans les cas de schizophrénie. Ces 6 processus sont en rapport avec le métabolisme énergétique. Mais même si cela n'est pas pour nous étonner, il faut noter que, parmi les 22 processus sélectionnés, 7 relèvent du métabolisme.

Les auteurs ont directement étudié, par 1H RMN, le métabolisme cellulaire au niveau du cortex préfrontal de patients humains (N = 10), d'individus contrôles (N = 12), de chimpanzés (N = 5) et de macaques (N = 6). La concentration de 20 métabolites identifiés a été mesurée. Les différences apparaissent clairement qui ne sont pas liées au genre, l'âge, la médication ou le délai *post-mortem*. Les métabolites les plus altérés sont la créatinine et le lactate (métabolisme énergétique), la choline et la glycine (neurotransmission) ou encore l'acétate, la choline, la phosphocholine, la glycerophosphocholine (métabolisme lipidique et membrane cellulaire).

En support de l'hypothèse évolution/schizophrénie, on retrouve les 9 composants qui diffèrent le plus entre les malades et les contrôles dans la liste de ceux qui ont évolué le plus rapidement dans notre lignage et pour 8 de ces métabolites, le changement est inverse (chez les schizophrènes) par rapport à celui observé au cours de notre évolution. On peut alors se tourner vers les gènes en relation avec ces métabolites et étudier leur évolution. Au niveau des séquences codantes, la différence avec le chimpanzé est supérieure pour ces 9 « voies ». Et il en va de même pour l'expression des mRNA (régulation). Cette étude limitée (nombre restreint des métabolites) souligne l'importance du métabolisme énergétique dans le fonctionnement cérébral et le poids que représente pour *sapiens* ce fardeau énergétique cérébral.

Dans un article récent, Fu et ses collègues suivent l'évolution métabolique rapide du cortex préfrontal humain. Rappelons que *sapiens* consacre 20 % de son énergie au cerveau, contre 11-13 % pour les singes et 2-8 % pour les autres mammifères, des chiffres en rapport avec la masse cérébrale – mais pas un rapport égal, puisque nous avons un cerveau 3 à 4 fois plus gros que celui d'un chimpanzé, ce qui laisse penser que nous travaillons « aux limites » (sinon il faudrait consacrer 40 % de

notre métabolisme au seul cerveau – mais peut-être avons nous fait des « économies » sur d'autres postes. Par exemple, si l'on considère le rôle des glies dans cet apport métabolique, même si, globalement, le rapport glie/neurones est conservé entre nous et les autres primates, il pourrait être supérieur dans le cortex préfrontal, distorsion qui marquerait une nécessité métabolique plus forte chez nous dans cette région particulièrement développée de notre cerveau.

Les auteurs ont mesuré la concentration de plus de 100 métabolites et celle d'environ 2000 protéines dans le cerveau de *sapiens* (N = 49), des chimpanzés (N = 11) et des macaques (N = 45) pris à différents âges et dans des régions distinctes. La question de l'âge est importante et difficile pour des raisons d'alignement entre les espèces différentes. Pour *sapiens*, les échantillons varient entre 0 et 98 ans, contre 0 et 40 pour les chimpanzés et 0 et 28 pour les macaques. Il apparaît que la différence entre espèces rend compte de 49 % des variations métaboliques contre 17 % pour l'âge et 9 % pour la région considérée, et que les différences principales se situent au niveau du cortex préfrontal.

Cette analyse est complétée par celle des enzymes correspondants entre 12 individus de chaque espèce, démontrant que 4 grandes voies métaboliques ont été particulièrement « accélérées » chez nous. Ces voies impliquent (i) les potentiations à long terme, (ii) les interactions ligand-récepteur, (iii) le métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate, (iv) le métabolisme de la β -alanine. Elles ne sont pas indépendantes et partagent à la fois des gènes et des métabolites communs comme le glutamate, dont la concentration est plus faible chez *sapiens* que chez les autres primates.

Pour résumer, dans les trois espèces, le métabolome change avec l'âge et nombre de ces changements diffèrent entre les 3 espèces. Le résultat le plus frappant est le facteur 4, approximativement, de différence du métabolome au niveau du cortex préfrontal, alors que le cortex cérébelleux ne montre aucune différence significative. On pourrait argumenter que ces changements sont liés au style de vie, le régime alimentaire en particulier, mais les auteurs ne trouvent pas de surreprésentation des métabolites associés à une diète ou une activité physique particulière. Le glutamate est un des métabolites qui montre les plus grandes différences de concentration dans le cortex préfrontal. Or la libération et le recyclage du glutamate constituent une voie métabolique majeure consommant de 60 à 80 % de l'énergie en provenance de l'oxydation du glucose dans le cortex cérébral humain.

Attardons-nous un moment sur la question du rapport glie/neurones. Herculano-Houzel et ses collègues rappellent que la taille du cerveau varie de 1 à 100 000 chez les mammifères et que, chez les rongeurs, la taille des cellules nerveuses augmente avec celle du cerveau, ce qui n'est pas le cas pour les cellules gliales. On peut donc imaginer que, chez les rongeurs, un plus gros cerveau n'a pas un nombre plus grand de neurones (proportionnellement) et que le rapport glie/neurones augmente. Si, chez les primates, la même règle de l'augmentation du rapport glie/neurones était conservée, un cerveau de 100 milliards de neurones, le nôtre donc, pèserait plus de 45 kg.

Dans ce contexte, l'article de Sherwood et collègues est intéressant car il suggère que le rapport glie/neurone diffère entre les régions du cortex et, pour une même région, entre les différents primates. Bien entendu, si les glies jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique, cela signifie qu'il n'est pas égal dans toutes les régions. À partir de là, les 20 % de consommation chez *sapiens* peuvent correspondre à 30, voire 40 % ou plus dans certaines d'entre elles et à moins de 20 % dans d'autres, ce qui dégage des marges de manœuvre.

Pour prolonger la réflexion sur un lien possible entre maladie mentale et métabolisme, deux approches sont possibles. Une première, laissée de côté cette année, consiste à lier l'activité des mitochondries à la régulation de la transcription nucléaire et à la stabilité du génome. Une deuxième consiste à prendre un gène candidat et à voir comment son étude pourrait nous amener sur une question touchant la physiologie mitochondriale. À cette fin, je vais prendre l'exemple de *DISC1*, pour « *Disrupted in Schizophrenia 1* ».

DISC1 a été identifié à partir d'une famille écossaise à travers une translocation chromosomique qui corrèle avec des troubles mentaux majeurs (dépressions, schizophrénie). Par la suite, ce gène a été génétiquement associé à ces désordres dans de nombreuses études et il est probable que *DISC1*, tout en n'étant pas un facteur décisif, confère un risque génétique pour certaines maladies de l'esprit.

Les études sur ce gène ont ouvert des pistes intéressantes, dont son rôle dans la migration et la morphogenèse des neurones, y compris chez l'adulte. Avant d'aller plus loin, j'indique que *DISC1*, *NRG1* et *Dysbindin*, trois gènes de susceptibilité à la schizophrénie interagissent génétiquement. Park et ses collègues ont démontré que *DISC1* joue un rôle essentiel dans la fonction des mitochondries en se liant à la Mitofilin, une protéine de la membrane interne des mitochondries et ont complété cette observation par l'analyse des fonctions mitochondriales dans des mutants *DISC1* et des mutants *Mitofilin* : Mitofilin et *DISC1* sont nécessaires au rôle des mitochondries dans la régulation de Ca⁺⁺ cytoplasmique. Cette régulation est importante au regard de l'implication de ce cation dans la presque totalité des fonctions cellulaires, en particulier dans la régulation de la fusion des vésicules au niveau de la synapse. Dans le même ordre d'idée, Atkin et collaborateurs démontrent que *DISC1* joue un rôle dans le transport des mitochondries.

Interactions neurones/astrocytes et métabolisme

Il est devenu clair que les astrocytes participent à la signalisation cérébrale par le biais de leur activité trophique. Un mécanisme impliqué est le couplage métabolique résultant de l'activité nerveuse. Le glucose entre dans le cerveau par transport à travers la barrière hémato-méningée et pénètre dans les cellules, dont les neurones et les astrocytes. Au contraire des neurones, les astrocytes forment du glycogène, rapidement converti en pyruvate/lactate et métabolisé grâce au cycle des acides tricarboxylique (cycle de Krebs) ou transformé en glutamate ou glucose. Glucose et lactate sont exportés vers les neurones comme source d'énergie. Le transport du lactate se fait *via* des transporteurs membranaires, les « monocarboxylate transporters » (MCT). MCT4 est exprimé par les astrocytes et MCT2 par les neurones (principalement). MCT1 est exprimé par les astrocytes, les cellules endothéliales vasculaires, les épendymocytes et les oligodendrocytes.

La mémoire à court terme repose sur des modifications post-traductionnelles locales comme des phosphorylations de récepteurs ou de l'édition d'ARN. La mémoire à long terme repose sur des activations génétiques qui peuvent devenir permanentes si la chromatine est modifiée. Cette mémorisation, la mémoire à long terme en particulier, est consommatrice d'énergie. Récemment, les groupes d'Alberini et Magistretti ont utilisé le test « *inhibitory avoidance* » (IA) pour étudier le rôle du métabolisme et du couplage neurone/glie dans la mémorisation à long terme. Ce test consiste à placer le rat dans un compartiment blanc très illuminé en face d'une porte coulissante. La porte est adsorbée dans le plancher donnant accès

au compartiment sombre. Le rat se retourne et on démarre le chronomètre pour évaluer le temps nécessaire à l'entrée complète dans le compartiment noir. La porte est refermée et on administre un choc électrique. Immédiatement après le rat est retiré. La mémorisation du choc est évaluée par le délai que le rat va mettre à pénétrer dans le compartiment noir quand on répètera le protocole.

Pour tester l'importance de la glycogénolyse dans cet apprentissage, les auteurs ont injecté du DAB, un inhibiteur de la phosphorylation du glycogène (la première étape menant à la synthèse de pyruvate et de lactate) soit 15 minutes avant, soit immédiatement après la tâche comportementale IA et constaté un effet fort sur la mémoire à long terme, les rats « drogués » ayant oublié le danger du compartiment noir après 24 heures. Cela démontre que l'apprentissage a besoin de la phosphorylation du glycogène, une étape « énergie-dépendante ». Comme seuls les astrocytes ont du glycogène, la mobilisation de leur glycogène est bien nécessaire à la mise en place d'une mémoire à long terme.

Les expériences suivantes établissent que cette mobilisation du glycogène résulte dans une libération locale de lactate et que l'administration de lactate reverse l'effet du DAB. L'utilisation d'antagonistes spécifiques des MCT démontre que les 3 canaux sont importants, et en particulier MCT2, le canal neuronal. En conclusion, le lactate, plutôt que le glucose, constitue le substrat énergétique de la mémorisation à long terme et ce lactate provient du glycogène hydrolysé dans les astrocytes, seule source de glycogène cérébral chez l'adulte. Donc, dans le passage de l'information synaptique, l'affaire ne se joue plus à 2 mais à 3, et le 3^e (l'astrocyte) est important pour fournir, sous forme de lactate, l'énergie indispensable à l'activité physiologique.

Replaçons ces résultats dans le contexte du cours. Chez les rongeurs, la taille des cellules nerveuses augmente avec celle du cerveau, ce qui n'est pas le cas pour les cellules gliales. D'où la possibilité que, chez les rongeurs, un plus gros cerveau n'ait pas forcément un nombre proportionnellement plus grand de neurones, mais un rapport glie/neurones qui augmente et des neurones capables – grâce à ce surplus d'énergie – de voyager « plus loin ». Chez les primates, hors hominidés et chimpanzés, il a été proposé que le rapport glie/neurone reste constant et que la formation de nouveaux neurones s'accompagne d'une augmentation du nombre des glies. Ce qui pourrait ne pas être le cas chez les humains dont le rapport glies/neurones est sensiblement plus élevé que chez les autres primates, chimpanzés compris, compte non tenu du fait que ce rapport n'est pas identique dans toutes les régions cérébrales – ce qui, si nous sommes sur la bonne voie, permettrait de doubler l'apport énergétique au niveau de neurones particulièrement importants, principalement dans le cortex préfrontal. On peut donc en conclure que si les maladies de l'esprit, pour prendre un terme très général, englobent une composante métabolique, alors les astrocytes deviennent une cible possible, par-delà les autres cibles essentiellement synaptiques.

Conclusion : des neurones dispendieux en énergie, cibles des maladies de l'esprit ?

Pour finir je vais me concentrer sur les types neuronaux les plus consommateurs d'énergie : évidemment, les neurones à longues projections (motoneurones, neurones dopaminergiques, neurones sérotoninergiques, neurones pyramidaux, etc.), mais aussi les interneurones GABA du cortex, très nombreux chez *sapiens*, qui en a même recruté à partir du pallium. Parmi eux, les neurones qui expriment la

parvalbumine et sont à décharge rapide, chacun d'entre eux inhibant les sorties de plusieurs dizaines de neurones pyramidaux. De cette interaction dépend l'équilibre inhibition/excitation qui joue un rôle fondamental dans la mise en place des périodes critiques puis dans les oscillations et leur synchronisation. Je développerai ces aspects l'année prochaine.

Pour cette année nous en restons aux neurones PV grands consommateurs d'énergie, dont la maturation post-natale est un élément clef de la période critique, période de plasticité au cours de laquelle le cortex s'adapte morphologiquement et physiologiquement au monde extracortical. Par exemple, un enfant non opéré de la cataracte avant 4 ans (date de fermeture de la plasticité pour la vision binoculaire) aura, la vie durant, un œil paresseux (perte d'acuité visuelle unilatérale). Ce qui veut dire que la plasticité s'ouvre, puis se ferme au cours de la maturation de ces neurones.

On est en droit de poser la question de la pertinence d'une focalisation sur les périodes critiques. Si on veut bien admettre que ces périodes ont pour fonctions physiologiques d'adapter le cerveau à son environnement, il me semble intéressant de proposer – à titre d'hypothèse – que les maladies de l'esprit soient considérées comme des maladies de l'adaptation. À partir de là, on doit s'intéresser aux interactions entre neurones inhibiteurs et sorties pyramidales, et concevoir que, de ce point de vue, de nombreux gènes peuvent se trouver impliqués, et que, dans le même temps, l'environnement joue un rôle, puisqu'il s'agit de s'y adapter.

L'hypothèse « période critique » est soutenue par le décours de ces maladies. Pour la schizophrénie, par exemple, les premiers signes apparaissent entre 12 et 15 ans. Ce simple constat nous renvoie à la métamorphose spectaculaire de la puberté, période critique s'il en est, au cours de laquelle le monde bascule dans une nouvelle forme de sexualisation et où le cerveau doit suivre. Parallèlement, on constate que la balance excitation-inhibition commence à bouger autour de 15 ans et se stabilise autour de 20 ans dans le cortex préfrontal. Une telle durée, pour peu que nous soyons en mesure d'être alertés par des signes avant-coureurs (prodrome) devrait permettre une intervention permettant une adaptation meilleure à ce nouveau monde.

Bien qu'ils s'adressent aux neurones PV du système visuel, les travaux que de Plessy et ses collègues sont particulièrement intéressants. Ils ont comparé le transcriptome de ces neurones PV à celui du reste du cortex. L'expérience a été faite à P28-29, c'est à dire au pic de la période critique pour la vision binoculaire et a permis d'identifier les 24 variations les plus fortes. On est frappé dans cette liste par le nombre de gènes du métabolisme de l'ATP et des composants de la chaîne de phosphorylation oxydative. Comme le disent les auteurs : « Ceci pourrait refléter l'activité métabolique intense de ces cellules à décharge rapide exprimant la parvalbulmine. ».

C'est sur cette hypothèse réitérée d'une composante métabolique dans les maladies de l'esprit que le cours prend fin cette année.

Références principales

Atkin T.A. *et al.*, « Disrupted in Schizophrenia-1 regulates intracellular trafficking of mitochondria in neurons », *Molecular Psychiatry*, 16, 2011, 122-124.

Babitt J.L. *et al.*, « Both noncoding and protein-coding RNAs contribute to gene expression evolution in the primate brain », *Genome. Biol. Evol.*, 2, 2010, 67-79.

- Bhogal B. *et al.*, « Modulation of dADAR-dependent RNA editing by the *Drosophila* fragile X mental retardation protein », *Nature Neurosci.*, 14, 2011, 1517-1526.
- Brandon N.J. et Sawa A., « Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1 », *Nature Reviews Neurosci.*, 12, 2011, 707-722.
- Breunig J.J. *et al.* « Neural stem cells : historical perspective and future prospects », *Neuron*, 70, 2011, 614-625.
- Deverman B.E. et Patterson P.H., « Cytokines and CNS development », *Neuron*, 64, 2009, 61-78.
- Enard W., « FoxP2 and the role of cortico-basal ganglia circuits in speech and language evolution », *Current Opinion in Neurobiology*, 21, 2011, 415-424.
- Esteller M., « Non-coding RNAs in human disease », *Nature Reviews Genetics*, 12, 2011, 861-874.
- Fietz S.A. *et al.*, « OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling », *Nature Neurosci.*, 13, 2010, 690-699.
- Fu X. *et al.*, « Rapid metabolic evolution in human prefrontal cortex », *PNAS*, 108, 2011, 6181-6186.
- Haygood R. *et al.*, « Promoter regions of many neural- and nutrition-related genes have experienced positive selection during human evolution », *Nature Genetics*, 39, 2007, 1140-1144.
- Haygood R. *et al.*, « Contrasts between adaptive coding and noncoding changes during human evolution », *PNAS*, 107, 2010, 7853-7857.
- Hébert J.M. et Fishell G., « The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required », *Nature Reviews Neurosci.*, 9, 2008, 678-685.
- Herculano-Houzel S. *et al.*, « Cellular scaling rules for primate brains », *PNAS*, 104, 2007, 3562-3567.
- Johnson R. *et al.*, « Human accelerated region 1 noncoding RNA is repressed by REST in Huntington's disease », *Physiol. Genomics*, 41, 2010, 269-274.
- Khalil A.M. *et al.*, « Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression », *PNAS*, 106, 2009, 11667-11672.
- Kiecker C. et Lumsden A., « Compartement and their boundaries in vertebrate brain development », *Nature Reviews Neurosci*, 6, 2005, 553-564.
- Konopka G. et Geschwind D.H., « Human brain evolution: harnessing the genomics (r) evolution to link genes, cognition and behavior », *Neuron*, 68, 2010, 231-244.
- Lui J *et al.*, « Development and evolution of the human neocortex », *Cell*, 146, 2011, 18-36.
- Mattick J.S. et Mehler M.F., « RNA editing, DNA recoding and the evolution of human cognition », *TINS*, 31, 2008, 227-233.
- Mattick J.S. *et al.*, « RNA regulation of epigenetic processes », *BioEssays*, 31, 2009, 51-59.
- Mclean C.Y. *et al.*, « Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits », *Nature* 471, 2011, 216-219.
- Mercer T.R. *et al.*, « Long non-coding RNAs: insights into functions », *Nat Rev Genet.*, 10, 2009, 155-159.
- Newbury D. et Monaco A., « Genetic advances in the study of speech and language disorders », *Neuron* 68, 2010, 309-320.
- Oldham M. *et al.*, « Conservation and evolution of gene co-expression networks in human and chimpanzee brains », *PNAS*, 103, 2006, 17973-17978.
- Park Y.U. *et al.*, « Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) plays essential roles in mitochondria in collaboration with Mitofilin », *PNAS*, 107, 2010, 17785-17790.

Patterson P.H., « Maternal infection and immune involvement in autism », *Trends in Molecular Medicine*, 17, 2011, 389-394.

Plessey C. *et al.*, « A resource for transcriptomic analysis in the mouse brain », *PLoS One*, 3, 2008 ; e3012.

Pollard K.S. *et al.*, « Forces shaping the fastest evolving regions in the human genome », *PLoS Genet.*, 2(10), 2006 ; e168.

Radakovits R. *et al.*, « Regulation of radial glial survival by signals from the meninges », *J. Neurosci.*, 29, 2009, 7694-7705.

Rakic P., « Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology », *Nature Reviews Neurosci.*, 10, 2009, 724-735.

Sherwood C.C. *et al.*, « Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex », *PNAS*, 103, 2006, 13606-13611.

Siegenthaler J.A. et Pleasure S.J., « We have got you 'covered': how the meninges control brain development », *Current Opinion in Genetic and Development*, 21, 2011, 249-255.

Suzuki A. *et al.*, « Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation », *Cell*, 144, 2011, 810-823.

Tilleman H. *et al.*, « Critical role of the embryonic mid-hindbrain organizer in the behavioral response to amphetamine and methylphenidate », *Neurosci.*, 163, 2009, 1012-1023.

Wu D. *et al.*, « De novo origins of human protein-coding genes », *PLoS Genetics*, 7, 2011 ; e1002379.

Xu A.G. *et al.*, « Intergenic and repeat transcription in human, chimpanzee and macaque brains measured by RNA-seq. », *PLoS Comput. Biol.* 6, 2010 ; e1000843.

Zilles K. et Amunts K., « Centenary of Brodmann's map – conception and fate », *Nature Reviews Neurosci.*, 11, 2010, 139-145.

SÉMINAIRES DE LA CHAIRE

Neurological and psychiatric diseases : a developmental perspective

Colloque qui s'est tenu les 15 et 16 mars 2012, avec les interventions suivantes :

- Marten Smid : Pitx3 mediated program of dopaminergic subset-specification ;
- Manuel Bouvard : Attention deficit disorder from childhood to adulthood: a developmental perspective ;
- Thomas Perlmann : Transcriptional control of developing and mature dopamine neurons ;
- Marie-Odile Krebs : Transcriptional control of developing and mature dopamine neurons ;
- Wolfgang Driever : Mechanisms of dopaminergic systems development in zebrafish ;
- Olivier Pascalis : Infants' knowledge of other, and Relationship ;
- Wolfgang Wurst : Unravelling the genetic network underlying DA neuron development ;
- Antonio Simeone : Otx2 in progenitors and adult mesencephalic-diencephalic dopaminergic neuron ;
- Roland Jouvent : Transnosological cognitive symptoms as darwinian adaptive processes ;

- Thomas Bourgeron : Genetic buffering and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders ;
- Oscar Marin : Migration and guidance of mdDA neurons ;
- Jeroen Pasterkamp, PhD : Wiring the dopamine system during development ;
- Catherine Barthélémy : Autism: Research asking questions to clinical studies ;
- Nitin Gogtay : Childhood onset psychotic disorders: Insights from Neuro Imaging Studies ;
- Kim Q. Do : Schizophrenia: Genes and environment interactions of redox control during development ;
- Philippe Rochat : The self in infancy ;
- Alain Prochiantz : Homeoprotein regulation and neurological/psychiatric diseases.

RECHERCHE

Migrations cellulaires et formation des bords

Cette année, nous nous sommes concentrés sur la migration des précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) et la formation des bords entre les domaines Pax6 et Nkx2.2 le long de l'axe dorso-ventral du tube neural. Ces travaux font suite à deux publications récentes (Layale *et al.*, *Development*, 2011 ; Di Lullo *et al.*, *Development*, 2011). Pour ce qui est des bords, nous avons observé que des pertes et gain de fonction *in vivo* de l'homéoprotéine (HP) Pax6 extracellulaire (poulet) modifie la taille du compartiment PMN et donc la position du bord entre les deux domaines. Cette observation doit être poursuivie mais est en faveur d'un rôle morphogénétique direct et précoce de ces facteurs de transcription à homéodomaine.

En ce qui concerne la migration, nous avons démontré que la signalisation par Pax6 extracellulaire publiée en 2011 nécessite une interaction avec le système « *netrin* ». Cette interaction entre une signalisation classique et la signalisation par HP semble donc répandue puisque nous l'avons déjà observée pour Engrailed (interaction avec DPP chez la drosophile et Ephrin/Eph chez les vertébrés).

Guidage des axones

Partant des travaux publiés en 2009 (Wizemann *et al.*, *Neuron*, 2009), nous avons démontré que Engrailed internalisée par les cônes de croissance régule localement la traduction de mRNA mitochondriaux et augmente la synthèse d'ATP. Cet ATP est sécrété, hydrolysé en Adénosine, laquelle transmet un signal *via* l'activation du récepteur AR1. Cette stimulation sensibilise le cône de croissance à la signalisation par le système EphrinA5/EphA2 (Stettler *et al.*, *Development*, 2012).

Périodes critiques

L'ouverture de la plasticité corticale dans le système visuel binoculaire (chez la souris) est contrôlée par l'internalisation de l'HP Otx2 par les inter-neurones GABAergiques à parvalbulmine du cortex visuel binoculaire (Sugiyama *et al.*, *Cell*,

2008). Cette internalisation requiert l'existence de sites de reconnaissance pour la protéine et aussi de séquences de la protéine capable de reconnaître ces sites. Nous avons identifié le domaine d'Otx2 et démontré que, par l'intermédiaire de ce domaine, Otx2 reconnaît un sucre complexe de la famille des chondroïtines sulfatés (CSD ou CSE). Enfin, nous avons aussi démontré que ce domaine peut être utilisé comme antagoniste du transfert d'Otx2 *in vivo*, ce qui conduit à une réouverture de la plasticité corticale chez l'adulte. De façon plus spectaculaire, cette réouverture permet de guérir l'amblyopie chez les souris adulte (Beurdeley *et al.*, *J. Neurosci.*, 2012).

Nous nous sommes aussi intéressés à l'origine d'Otx2 et avons démontré que 40 % de la protéine provient du plexus choroïde. Nous avons donc recombiné Otx2 dans le plexus et montré que cela permet une réouverture de la plasticité corticale avec, là encore, guérison de l'amblyopie chez les souris (Spatazza *et al.*, soumis pour publication).

Pathologies

Nous avons démontré en 2007 (Sonnier *et al.*, *J. Neurosci.*, 2007) que *Engrailed1/2* est fortement exprimé dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques (mDA) et que ces neurones meurent progressivement chez les souris hétérozygotes pour *En1*. L'infusion de la protéine *En1* suivie de son internalisation par les neurones sauve ces cellules de la dégénérescence.

Nous avons étendu cette observation en démontrant que ce sauvetage passe par la traduction locale, sous le contrôle de *En1* des messagers mitochondriaux codant pour des protéines mitochondriales du complexe I (Alvarez-Fischer, Fuchs *et al.*, *Nature Neurosci.*, 2011). Dans ce même travail, nous démontrons l'action protectrice d'*En1* dans d'autres modèles *in vivo* dont le MPTP, la 6-OHDA et l'infusion d'alpha-synucléine mutée (A30P). Toujours dans le modèle de la maladie de Parkinson, mais aussi du rôle physiologique normal d'*Engrailed*, nous avons identifié de nombreuses cibles traductionnelles et transcriptionnelles de la protéine dans les neurones mDA. Cette étude en cours de finalisation nous amène à évaluer la possibilité d'un rôle des HP dans la stabilité du génome, en particulier dans la protection contre les cassures double brin de l'ADN induites (hypothèse) par l'activation de séquences LINE et SINE dans des conditions de stress oxydatif.

Dans le même ordre d'idée, nous avons développé un modèle expérimental de glaucome chez la souris et utilisé Otx2 comme protéine thérapeutique. Cette protéine injectée dans la cavité oculaire et internalisée par les neurones ganglionnaire (RGC) sauve la totalité de ces neurones dans le modèle d'excitotoxicité au NMDA et dans un modèle de lésion du nerf optique. Otx2 non seulement sauve les cellules mais préserve l'acuité visuelle des souris (Torero-Ibad, Rhee *et al.*, *J. Neurosci.*, 2011).

Travaux des équipes de chaire

Alain Joliot

L'activité de l'équipe est principalement centrée sur l'étude du transfert intercellulaire des homéoprotéines, de la caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu (sécrétion et internalisation), jusqu'aux conséquences physiologiques du transfert. Nous avons récemment mis en évidence un rôle des

PIP2 dans la sécrétion non-conventionnelle des homéoprotéines. Ces phospholipides sont capables d'interaction directe avec les homéoprotéines, vraisemblablement au niveau de l'homéodomaine, et l'inhibition de cette interaction par compétition (néomycine, domaine PH de la PLC δ) diminue l'association de l'homéoprotéine avec les membranes cellulaires ainsi que sa sécrétion. Compte tenu de leur implication démontrée dans la sécrétion non conventionnelle du FGF2 et de la protéine Tat du HIV, les PIP2 pourraient définir une nouvelle voie de sécrétion partagée par des protéines fortement basiques et souvent localisées dans le noyau. Dans la continuité de ces résultats, les travaux en cours consistent à étudier les rôles respectifs des différents *pools* intracellulaires de PIP2 dans le processus de sécrétion, et celle de l'interaction homéoprotéine/lipide sur la conformation de la protéine et son insertion dans les membranes biologiques. En parallèle, grâce aux collaborations établies avec les équipes d'Alain Prochiantz et de Florence Maschat, nous avons contribué à démontrer le rôle physiologique du transfert de l'homéoprotéine Pax6 dans les processus de migration des OPCs et celui de l'homéoprotéine Engrailed dans la formation des veines de l'aile de *Drosophila*. Un dernier aspect de notre activité consiste en l'optimisation des stratégies de vectorisation protéiques basées sur les séquences de transduction peptidique (PTD ou CPP) dans des systèmes *in vivo*.

Nathalie Rouach

Une propriété clé des astrocytes est leur communication intercellulaire directe *via* des réseaux étendus formés par de nombreux canaux jonctionnels. Le rôle de ces réseaux dans la transmission et la plasticité synaptique est cependant inconnu. Nous avons récemment montré que la déconnexion des astrocytes, par l'inactivation des connexines 30 et 43, augmente la transmission synaptique des cellules pyramidales de l'aire CA1 de l'hippocampe. Cet effet est dû à une capture inadéquate de potassium et de glutamate par des astrocytes hypertrophiés, réduisant le volume de l'espace extracellulaire. Ainsi, les réseaux astrocytaires dictent les concentrations extracellulaires de glutamate et potassium durant l'activité synaptique. L'inhibition des réseaux astrogliaux a de multiples conséquences sur la neurotransmission – augmentation de l'excitabilité neuronale, de la probabilité de libération des neurotransmetteurs, de l'insertion de récepteurs AMPA postsynaptiques –, diminuant ainsi le nombre de synapses silencieuses. Ceci a des conséquences majeures pour la plasticité synaptique car la conversion de synapses silencieuses en synapses fonctionnelles chez les souris invalidées pour les connexines 30 et 43 déplace fortement l'équilibre entre la potentiation et la dépression à long-terme, favorisant la dépression synaptique. Ainsi, notre travail montre que la communication jonctionnelle des réseaux astrogliaux est cruciale pour le transfert, le traitement et le stockage d'une information synaptique précise.

Sophie Vrız

Signalisation purinergique et recrutement de cellules progénitrices après lésion

Un enjeu majeur en médecine régénérative est le contrôle de la mobilisation des cellules progénitrices. Nous avons montré que l'amputation de la nageoire induit deux vagues d'apoptose régulées dans le temps et l'espace. La deuxième vague d'apoptose est régulée par la libération de ROS au niveau de la lésion et son

inhibition bloque la régénération en empêchant la formation du blastème et la croissance des nerfs. Nos résultats montrent que la voie purinergique est un relais entre l'apoptose et la régénération.

Formation de la frontière mésencéphale/diencéphale

Nous avons étudié le rôle paracrine de l'homéoprotéine Engrailed dans la mise en place de la frontière mésencéphale/diencéphale chez le poisson zèbre. Pour cela, nous avons utilisé deux stratégies : (1) un blocage de la protéine En à l'extérieur des cellules à l'aide d'un anticorps spécifiques, (2) une surexpression d'une protéine EnER^{T2} dont l'activité est contrôlée par la lumière.

PUBLICATIONS 2011-2012

A. Prochiantz et équipes de chaire (A. Joliot, N. Rouach, S. Vríz)

Torero-Ibad R., Rhee J., Mrejen S., Foster V., Picaud S., Prochiantz A.¹ et Moya K.*, « Otx2 promotes the survival of damaged adult retinal ganglion cells and protects against excitotoxic loss of visual acuity *in vivo* », *J. Neurosci.*, 31, 2011, 5495-5503.

Layalle S., Volovitch M., Mugat B., Bonneaud N., Parmentier M.-L., Prochiantz A., Joliot A.* et Maschat F.*, « Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly », *Development*, 138, 2011, 2315-2323.

Alvarez-Fisher D.*, Fuchs J.*, Castagner F., Stettler O., Massiani-Beaudoin O., Moya K.L., Bouillot C., Oertel W.H., Lombès A., Faigle W., Joshi R.L.*, Hartmann A.* et Prochiantz A.*, « Engrailed proteins protect mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults and regulate their physiology », *Nature Neurosci.*, 14, 2011, 1260-1266.

Di Lullo E., Haton C., Le Poupon C., Volovitch M., Joliot A., Thomas J.-L.* et Prochiantz A.*, « Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube », *Development*, 138, 2011, 4991-5001.

Dupont E., Prochiantz A. et Joliot A., « Penetratin story: an overview », *Methods Mol. Biol.*, 683, 2011, 21-29.

Pannasch U., Vargova L., Reingruber J., Ezan P., Holcman D., Giaume C., Sykova E. et Rouach N., « Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity », *Proceedings of the National Academy of Science (États-Unis)*, 108, 2011, 8467-8472.

Mehmood T., Schneider A., Sibille J., Marques Pereira P., Pannetier S., Ammar M., Dembele D., Thibault-Carpentier C., Rouach N. et Hanauer A., « Transcriptome profile reveals AMPA receptor dysfunction in the hippocampus of the Rsk2-knockout mice, an animal model of Coffin-Lowry Syndrome », *Human Genetics*, 129, 2011, 255-269.

Freche D., Pannasch U., Rouach N. et Holcman D., « Synapse geometry and receptor dynamics modulate synaptic strength », *PLoS One*, 6(10), 2011 ; e25122.

Hoang T.Q., Rampon C., Freyssinet J.M., Vríz S. et Kerbiriou-Nabias D., « A method to assess the migration properties of cell-derived microparticles within a living tissue », *BBA-General Subjects*, 810(9), 2011, 863-866.

Ceccaldi A., Champion C., Rampon C., Sénamaud-Beaufort C., Ponger L., Jurkowska R., Gagey N., Dali Dali Ali H., Lequin O., Tost J., Vríz S., Dauzonne D., Jeltsch A., Guianvarc'h D. et Arimondo P. « In quest of DNA methyltransferase inhibitors: new flavones and flavanones

1. co-premier auteur.

derivatives were identified through High-Throughput Screening » *Chem. Bio. Chem.*, 12, 2011, 1337-45.

Beurdeley M.*, Spatazza J. *, Lee H.H.C.*, Sugiyama S., Bernard C., Di Nardo A.A., Hensch T.K.* et Prochiantz A.*, « Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex », *J. Neurosci.*, 32, 2012, 9429-9437.

Stettler O., Joshi R.L., Wizenmann A., Reingruber J., Holcman D., Bouillot C., Castagner F., Prochiantz A.* et Moya K.L.*, « Engrailed homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate ephrin A5 function in retinal growth cones », *Development*, 139, 2012, 215-224.

Pannasch U., Derangeon M., Chever O. et Rouach N., « Astroglial gap junctions shape neuronal network activity », *Communicative and Integrative Biology* 5, 2012, 1-7.

Freche D., Lee C.Y., Rouach N. et Holcman D., « Synaptic transmission in some cognitive disorders dissected by a quantitative approach », *Communicative and Integrative Biology*, sous presse.

Xu L., Feng Z., Sinha D., Ebenstein Y., Gauron C., Le Saux T., Lin S., Weiss S., Vríz S., Jullien L. et Bensimon D., « Spatio-temporal manipulation of retinoic acid activity in zebrafish hindbrain development via photo-isomerization », *Development*, sous presse.

Ellertsdottir E.*, Berthold P.*, Bouzaffour M., Tillet M., Trayer V., Gauron C., Dufourcq P., Huber P., Vríz S., Affolter M. et Rampon C. « Protease-activated receptor 1 (PAR1) promotes vascular maturation in the zebrafish embryo », *PLoS One*, sous presse.

Ouvrage

Prochiantz A., *Qu'est-ce que le vivant ?*, Seuil, Paris, 2012.

BREVETS

A. Prochiantz, K. Moya & R. Joshi, 2012 : *Use of Engrailed for increasing dopamine synthesis by dopaminergic neurons*. PCT/IB2012/050949.

PARTICIPATION À DES CONGRÈS DE ALAIN PROCHIANTZ

Peptide Vectors and Delivery of Therapeutics. 19-21 mai 2011, Tallinn, Lituanie.

Systems Biology of Dopaminergic Neurons. 28-20 avril 2011, Freiburg, Allemagne.

The Plastic Brain. 8-9 juin 2011, Bâle, Suisse (*keynote lecture*).

FEBS Congress. Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Turin, Italy.

Chemistry and Biology of Peptides. 27 juillet 2012, Oxford, UK (*keynote lecture*).

HOX and TALEs Transcription Factors in Development and Diseases. 28 septembre-1^{er} octobre 2011, Carry Le Rouet, France (*keynote lecture*).

Brain Plasticity: itself a plastic concept? 7-8 mai 2012, New York, États-Unis.

DOPAMINET : Molecular networks of dopaminergic neurons in chordates. 19-21 juillet 2012, Trieste, Italie.

