

Processus morphogénétiques

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

COURS : ÉVOLUTION DE LA RÉGÉNÉRATION

Embryogenèse silencieuse

L'idée de régénération est souvent associée à celle de réparation et ne s'inscrit pas, ou pas suffisamment, dans une conception des organismes vivants comme des entités en renouvellement permanent, au niveau moléculaire, cellulaire et physiologique.

C'est pourquoi j'entrerai dans le sujet par l'aphorisme bernardien « la vie c'est la mort, la vie c'est la création » qui s'oppose à celui de Bichat, beaucoup plus connu « La vie est l'ensemble des forces qui s'opposent à la mort. »

Pour Bichat, en accord avec le deuxième principe de la thermodynamique, les organismes sont des machines qui résistent à l'augmentation de l'entropie jusqu'au moment où le désordre l'emporte. Bernard propose une vision complètement différente. Pour lui le vivant se détruit et se reconstruit à chaque instant dans un équilibre qui est celui de la physiologie. Au cours du développement, la construction l'emporte mais chez l'adulte nous avons un état d'équilibre entre mort et création et les états pathologiques sont vus comme les conséquences d'une perturbation de cet équilibre.

Malgré la révolution portée par Claude Bernard, nous vivons toujours, partiellement, dans une conception physicaliste du vivant. Une raison en est le présupposé idéologique naïf que le vivant étant matériel, il relève des sciences physiques. L'argument est simple. Une science du vivant doit prendre en compte théoriquement des propriétés qui sont spéciales au vivant, comme la reproduction, le développement, ou l'évolution et cela implique la mise en place de concepts qui participent d'une théorie du vivant, distincte de la physique ou de la chimie, même s'il y a des recouvrements et des interfaces entre ces disciplines.

Une autre raison du physicalisme biologique est que la génétique moléculaire est une application en biologie de la théorie de l'information, donc du deuxième principe de la thermodynamique. Si nous considérons une cellule comme un ensemble fermé, n'échangeant ni matière ni information avec l'extérieur (2^e principe oblige), le maintien d'un bas niveau d'entropie demande un haut niveau d'information ($I = \text{colog}(p)$).

Le bonhomme de Maxwell ici ne trie pas les molécules en fonction de leur vitesse, mais maintient l'ordre au niveau génétique. Cette vision a permis des progrès spectaculaires en biologie. Mais son arrière plan physicaliste a imprégné notre façon de penser le vivant au point que nous sommes restés longtemps aveugles à certaines de ses propriétés, parmi lesquelles son extraordinaire plasticité, voire fluidité, morphologique.

C'est de cela que nous allons parler cette année. La fluidité morphologique, la place qui lui est faite dans l'économie générale des organismes, régénération qui se poursuit en silence et qui est aussi une morphogenèse. C'est là une façon intéressante de penser la physiologie, et les pathologies qui traduisent un déséquilibre dans ce double mouvement de mort et de création organique.

Pour donner un chiffre qui parle, nous perdons chaque année (et regagnons) notre propre poids en cellules. Ce renouvellement est bien illustré par notre épiderme dont les cellules souches permettent le renouvellement continu et normal. Nous sommes là dans un modèle où le renouvellement n'est pas induit par une lésion, il ne s'agit pas d'une cicatrisation et de son fort composant inflammatoire, mais du mode naturel de la vie et de la mort « la vie c'est la mort » des éléments du tissu épithélial.

C'est un cas de renouvellement homéostasique qu'on retrouve pour le système hématopoïétique, les cellules de la bordure intestinale, et même le système nerveux pour certaines de ses composantes. Cela implique une régulation fine, la vie équilibrant parfaitement la mort. On doit donc se rendre à l'évidence : l'anatomie animale est bien plus dynamique qu'on ne le pensait.

On peut s'interroger sur l'origine de cette mort régulière des cellules. Est-elle induite ? Est-elle autonome, liée au raccourcissement des télomères qui, au niveau des chromosomes, accompagne chaque division cellulaire ? En retour, une cellule qui meurt envoie-t-elle un signal aux cellules souches : « il est temps de nous envoyer une remplaçante » ? Et ce signal ou un autre peut-il guider cette remplaçante au site laissé « vide » par la mort du précédent occupant ? Ces questions qui peuvent sembler simples quand il s'agit de la peau ou de l'intestin sont plus complexes quand il s'agit du système nerveux car le nouveau neurone doit s'intégrer physiologiquement dans le réseau en place. Ce remplacement ne se fait pas forcément à l'identique, la cellule non plus n'est pas identique – y compris au niveau de son génome – et nous avons là un instrument remarquable d'individuation – évolution de l'individu – modalité importante d'adaptation chez les vertébrés.

Enfin, les cellules souches doivent survivre et se diviser pour se reproduire. Cette division peut conduire à la formation de deux cellules souches ou d'une cellule souche et d'une cellule commise à un destin différencié. Ce qui soulève le problème

du vieillissement des cellules souches. Les cellules souches qui se sont divisées plusieurs fois sont-elles toujours jeunes ? Et si oui, pourquoi ? On évoque leur environnement, des niches, qui les maintiendraient dans l'état « souche ». Cet état est lié à une conformation de la chromatine dans laquelle des groupes de facteurs à activité épigénétique jouent un rôle important. Par ailleurs, il se pourrait que les cellules souches entretiennent un rapport particulier avec leurs télomères : le maintien de l'activité télomérase en dépit de la prolifération cellulaire conférerait aux cellules souches une immortalité relative.

Réparations

ADN

Rien n'est stable dans un organisme, que ce soit au niveau moléculaire ou à un niveau supérieur d'intégration, le niveau cellulaire n'étant qu'un de ces niveaux. Tout se dégrade, mais tout se reconstruit. L'ADN lui-même est une structure éminemment instable nécessitant des réparations constantes, qui ne vont pas sans erreurs, mais sans lesquelles les organismes ne feraient pas long feu. Des maladies existent, marquées par un vieillissement prématuré, et occasionnées par des mutations dans les systèmes de réparation. Nous devons aussi réaliser que, même sans accidents, le génome est l'objet de modifications dans sa séquence même, c'est-à-dire abstraction faite, dans un premier temps, des modifications épigénétiques de la chromatine. Ces modifications de séquence, le plus souvent par transposition, ont des conséquences dans l'évolution des espèces, mais aussi celle des individus : l'individuation.

Tous les systèmes de réparation impliquent des enzymes spécifiques dont la mutation peut conduire à des états pathologiques. Pour nous limiter au système nerveux, des déficiences des systèmes de réparation de l'ADN sont à l'origine de nombreuses pathologies : microcéphalies, dégénération nerveuse, tumeurs cérébrales. D'une façon très générale, le vieillissement cérébral et certaines maladies liées à ce vieillissement, maladies de Parkinson ou d'Alzheimer, peuvent prendre leur origine dans des défauts de réparation de l'ADN, nucléaire ou mitochondrial.

Il faut pour le système nerveux distinguer deux périodes : celle du développement où les erreurs et cassures affectent, pour une part importante les cellules en prolifération, et les périodes plus tardives qui concernent plutôt les cellules post-mitotiques. Comme, malgré l'existence des cellules souches adultes, en particulier au niveau de la zone subventriculaire et de l'hippocampe, nombre de neurones sont présents jusqu'à la mort du porteur, il est clair que ces cellules doivent bénéficier de puissants systèmes de réparation et que des mutations dans ces systèmes peuvent avoir des effets délétères sur la physiologie cérébrale.

Membranes

Longtemps nous nous sommes imaginés que les membranes étaient des sortes de « mur de Berlin ». Depuis peu, nous avons pris conscience de leur fragilité et de leur nécessaire réparation. On connaît mal les mécanismes de réponse rapide, de l'ordre de

la seconde, au « trouble » des membranes. Pourtant, il s'agit d'une question importante car ce trouble se produit de façon physiologique, comme l'ont montré certains travaux sur les fibres musculaires. La réparation membranaire est une opération continue et la perte de cette propriété est à l'origine de plusieurs pathologies.

D'un point de vue évolutif, la réparation est avantageuse par rapport au remplacement complet de la cellule. En fait la lésion, indépendamment de son origine (bactérie pathogène, disruption physique,...) est suivie de la fusion rapide de vésicules avec la membrane. Une telle fusion prend à contre-pied l'idée d'une réparation spontanée née de l'analyse de membranes artificielles. Ces réparations spontanées ne sont possibles que si les lésions sont limitées en taille ($< 1 \mu\text{m}$) à cause de la tension superficielle imposée par le cytosquelette sous-jacent.

Dans le cas de grandes disruptions de la membrane, on invoque la fusion de vésicules induite par l'entrée de calcium. La nature de ces vésicules n'est pas claire. Plusieurs possibilités existent : endosomes, lysosomes, autres. Ces vésicules fusionnent entre elles puis avec la membrane. La fusion vésiculaire a été très étudiée dans le système nerveux et on connaît des molécules, les SNARES, qui catalysent cette fusion ; des toxines aussi, qui bloquent ces fusions et la réparation des membranes, suggérant une communauté de mécanismes entre réparation et fusion vésiculaire dans le système nerveux. Cette communauté s'étend aux ferlins proches des synaptotagmines du système nerveux, senseurs calciques et catalyseurs de la fusion. Les ferlins ont un domaine transmembranaire et des sites de fixation au calcium et pourraient faciliter ces fusions vésiculaires ou les fusions des « enlargeosomes » (créés par la fusion des vésicules entre elles) avec la membrane plasmique. La dysferlin a donné lieu à un modèle murin d'invalidation qui induit une forme de myopathie.

Un pas dans la compréhension moléculaire de ces phénomènes a été accompli avec l'identification d'une protéine de 53 KDa (MG53) exprimée par les cellules musculaires. Les souris invalidées pour MG53 survivent jusqu'à 11 mois puis développent une myopathie. Soumises à des cycles répétés d'un exercice physique intense, elles développent une altération de la membrane musculaire par défaut de réparation des lésions causées par le stress de l'activité physique.

On peut légitimement penser que ce phénomène n'est pas restreint aux muscles et affecte tous les tissus. Avec le vieillissement, comme celle de l'ADN, la réparation des membranes pourrait s'affaiblir. *A contrario*, on peut se poser la question du sens physiologique de cette fragilité. Quel pourrait être son rôle ? Des travaux issus de mon laboratoire ont établi le phénomène de transduction protéique impliquant le passage de protéines d'une cellule à l'autre. Nous avons avancé que ce passage implique une déstabilisation provisoire des membranes plasmiques. Bien entendu, ce passage exige que des domaines de la protéine aient évolué en ce sens. Nous avons identifié dans la protéine un court domaine qui traverse la membrane plasmique et construit des variants inactifs de ce domaine. Quand on compare par RMN du phosphore l'effet de l'addition de ces peptides sur les structures membranaires (phospholipides cérébraux), on réalise que seul le peptide qui entre est capable d'induire la formation de micelles inverses, signes d'une déstabilisation.

Hydres et planaires

Hydres

La régénération est présente dans de nombreux phylums et absente dans d'autres, sans corrélation avec la place dans l'histoire de l'évolution. Par exemple, les nématodes ou les rotifères ont un nombre fixe de cellules et ne régénèrent pas, quand des animaux plus anciens, les hydres par exemple, ou plus récents, les tritons ou les poissons, le font. Une explication possible est que la régénération serait une propriété générale des métazoaires, perdue secondairement dans certains phylums.

Les hydres, embranchement des cnidaires, sont, depuis Trembley, les superstars de la régénération. N'importe quel fragment d'hydre de taille supérieure à quelques centaines de cellules (300 environ) peut régénérer pour donner une hydre complète. Ces cellules reforment une hydre même si elles sont dissociées et réagrégées en un petit culot cellulaire. Cette capacité régénératrice est liée à une production continue de cellules et de facteurs à activité morphogénétique. La régénération chez les hydres est donc un modèle formidable pour l'étude de la formation de patterns *de novo* et démontre que la mise en place de champs morphogénétiques, essentielle pour que les organes se différencient, doit précéder cette différenciation.

Cette remarque amène à rappeler la dichotomie proposée par Thomas Hunt Morgan au début du xx^e siècle entre morphallaxis et épimorphosis. La morphallaxis est une régénération qui prend place en l'absence de divisions cellulaires alors que l'épimorphosis exige une telle prolifération, en particulier celle des cellules souches. Dans la morphallaxis, les tissus en place se remodelent sur le plan de types cellulaires et sur le plan de la forme des ensembles pluricellulaires, démontrant une extraordinaire plasticité du système (au niveau des lignages et de la forme). En revanche, l'épimorphosis demande la formation d'un blastème indifférencié à partir duquel les tissus se reconstruisent à travers un processus proche d'une nouvelle embryogenèse. Les deux modes de régénération peuvent coexister, il en est ainsi pour les planaires et les salamandres, et même pour les hydres dont la régénération de la tête demande une prolifération cellulaire et la mise en place d'un centre organisateur.

La régénération chez l'hydre partage de nombreux points de convergence avec le développement. Certains gènes sont spécifiquement engagés dans la régénération, laquelle s'accompagne de l'expression d'un très grand nombre de protéases qui pourraient participer au remodelage des tissus accompagnant la morphallaxis. Plus généralement, la mésoglie, couche intermédiaire entre ectoderme et endoderme, et les éléments de la matrice extracellulaire sont fortement impliqués dans la régénération. L'ancrage des cellules à la mésoglie est fondamental, comme est fondamentale une taille minimale de départ estimée à 300 cellules environ.

Cette régénération après réagrégation de cellules dissociées impliquent qu'au sein de ces cellules résiduelles se mettent en place les champs morphogénétiques, ce qui pourrait expliquer la nécessité d'un nombre minimum de cellules. Quelques modèles peuvent être proposés. Par exemple, les cellules dissociées pourraient avoir

gardé une mémoire épigénétique de leur position et/ou de leur type. Autre possibilité, la dissociation entraîne la réexpression d'inducteurs, mais cette expression est stochastique et n'atteint un seuil efficace que dans un petit pourcentage de cellules.

Arrivons-en à la question centrale des cellules souches. Elles se définissent par leur capacité à proliférer sans limite et à se différencier pour donner naissance à tous les types cellulaires, elles sont totipotentes. Chez l'hydre, toutes les cellules épithéliales de la niche de la région gastrique sont des cellules souches. L'introduction de quelques cellules transgéniques exprimant la protéine fluorescente GFP dans un polype normal conduit rapidement à un animal dont toutes les cellules endodermiques expriment la GFP, ce qui démontre un renouvellement total. Les cellules de départ se multiplient, se déplacent dans les deux directions axiales et adoptent les propriétés qui correspondent à leur position, ce qui suggère l'existence de champs morphogénétiques et d'une information positionnelle chez l'hydre adulte.

Ce qui pose la question de la nature chimique de cette information. De nombreux modèles reposent sur l'existence d'inducteurs peptidiques. Par exemple HEADY, peptide de 12 acides aminés, est un puissant inducteur du domaine apical, suffisant pour l'induction de la tête. Le peptide Hym-301, synthétisé par les cellules de l'ectoderme de la zone des tentacules, contrôle leur nombre. À l'autre extrémité de l'axe, deux peptides PEDIN et PEDIBIN, accélèrent la régénération du pied. Le mode d'action de ces peptides, inducteurs ou morphogènes, reste à élucider.

Une approche très efficace est fondée sur une possible conservation évolutive des systèmes de signalisation. C'est ainsi que des facteurs connus pour leur activité morphogénétique chez les arthropodes ou les vertébrés ont été découverts chez l'hydre. Je prendrai dans ce résumé l'exemple de la famille Wnt.

Les Wnts sont des molécules sécrétées à activité signalisante et des morphogènes (cours 2007 et 2008). Les hydres ont autant de gènes Wnts que les vertébrés, et tous les composants des cascades Wnt (canonique et non canoniques), y compris les inhibiteurs comme *dickkopf*. Cela démontre que la diversification de cette famille s'est faite avant la séparation entre cnidaires et bilatères. En revanche, aucun Wnt n'a été identifié chez les unicellulaires et il est possible que l'apparition et la diversification des Wnts ait accompagné la naissance des animaux multicellulaires. L'expression emboîtée des Wnts au cours du développement rappelle ce qui est connu pour les gènes Hox chez les métazoaires plus avancés. Il n'est donc pas impossible que l'expression oral-aboral des Wnts serve de signalisation positionnelle chez l'hydre et que le code Hox soit une invention de Urbilateria. Ces gènes jouent aussi un rôle dans la régénération. Par exemple, pendant la régénération de la tête, Wnt3a est le premier gène Wnt exprimé à l'extrémité de l'axe en régénération et le Wnt *pathway* est nécessaire à la formation et au maintien du « *head organizer* ».

Planaires

Les planaires appartiennent à l'embranchement des plathelminthes. Leur symétrie bilatérale marque une complication par rapport aux hydres, puisque nous devons ajouter une différenciation dorso-ventrale (DV), voire médiolatérale (ML) si la

symétrie bilatérale n'est pas parfaite, à la différenciation antéro-postérieure (AP). Le corps de ces vers est aplati et présente 3 feuilletts, dont un feuillet mésodermique absent chez les hydres diploblastiques. À l'inverse des hydres, les planaires régénèrent les structures manquantes en générant un blastème grâce à la prolifération de cellules souches somatiques, les néoblastes. C'est donc un cas d'épimorphose. Ce bourgeon est constitué d'une couche de cellules épithéliales recouvrant une structure mésenchymateuse, un cas classique d'interaction épithélium-mésenchyme à l'œuvre dans la croissance et la régénération de nombreux organes. De ce point de vue, les planaires sont plus proches des vertébrés que les hydres, ce qui correspond à leur position évolutive.

La planaire *S. mediterranea* est très utilisée car facile à analyser par les moyens de la génétique (diploïdie stable) et présente sous des formes à reproduction exclusivement sexuelle ou asexuelle, ce qui permet de comparer développement et régénération. Enfin, le séquençage de son génome a été achevé, rendant possible l'identification des orthologues de nombreux gènes impliqués dans le développement des vertébrés.

En dehors du renouvellement homéostatique, le stimulus pour la régénération est la blessure. Cette blessure, suivie d'une contraction qui réduit sa taille et d'une sécrétion de mucus, est recouverte par les cellules épithéliales en provenance des domaines dorsaux et/ou ventraux, mais sans prolifération. Dans une coupe transverse, l'épithélium de réparation recouvre les différents types de tissu (nerveux, endodermique, mésenchymateux). On ne connaît pas la nature du signal qui initie la régénération, non plus qu'on ne mesure l'importance de l'interaction mésenchyme épithélium.

Chez les planaires adultes, la division cellulaire est un phénomène permanent qui participe à l'homéostasie de l'animal et suggère un renouvellement cellulaire constant à l'exception des cellules qui sont à l'avant des photorécepteurs et du pharynx, dont l'intégrité résulte d'un processus migratoire et non prolifératif. En cas d'amputation, une poussée locale de prolifération cellulaire se produit, qui conduit à la formation d'un bourgeon ou blastème de régénération. Dans la situation homéostatique, comme dans la phase de régénération, ce sont les néoblastes qui se divisent. Ces petites cellules, constituent 25 à 30 % de la population cellulaire totale et sont capables de donner tous les types cellulaires, ce qui signe leur statut probable de cellules souches adultes.

Quand une planaire est coupée transversalement, les deux fragments sont capables de régénérer. La polarité de la régénération est marquée par le fragment régénéré, tête sur tronc, tronc sur tête. Le fait qu'un fragment intermédiaire puisse régénérer tête (à l'avant) et queue (à l'arrière) démontre l'existence d'une polarité. Certains fragments ne régénèrent pas, par exemple ceux qui sont à l'avant des photorécepteurs, cela sans doute du fait de l'absence de néoblastes dans ce domaine.

Une amputation latérale, en absence de cicatrice en position antérieure, peut régénérer une tête perpendiculaire à l'axe AP d'origine. C'est donc l'axe AP plutôt que l'orientation de la section qui détermine le type de structure régénérée. Comme pour les hydres, on note l'importance des gènes Wnts et l'annulation de la

signalisation Wnt canonique chez *S. mediterranea* conduit à la régénération d'une tête postérieure chez l'animal amputé de la queue. Des régions antérieures ectopiques apparaissent aussi sur le flan d'animaux non lésés, ce qui suggère un rôle des Wnts aussi dans l'homeostasie normale de la planaire. À l'inverse, l'activation de cette voie est suffisante pour promouvoir une identité postérieure après amputation de la tête (une queue antérieure).

Il reste beaucoup à faire pour comprendre le mode d'action des Wnts et il ne faut pas oublier que d'autres facteurs sont impliqués (se reporter au cours) et que l'acquisition d'une symétrie bilatérale implique un *patterning DV*. Ce *patterning* est important, le tissu nerveux est en effet ventral (comme chez tous les invertébrés) et les différents organes (yeux, gonades) occupent des positions distinctes le long de cet axe secondaire qui, comme chez les autres métazoaires, est régulé par l'activité de la voie BMP.

Régénération chez les vertébrés dits inférieurs

Généralités

Tous les organismes ont acquis au cours de l'évolution des stratégies de maintien de leur forme. Des exemples classiques d'homéostasie cellulaire sont les lignages de cellules sanguines, l'épithélium intestinal, certaines régions limitées du système nerveux, ou encore la peau. Par ailleurs, de nombreux organismes se départissent régulièrement de parties importantes : la peau chez les serpents, les plumes chez les oiseaux, les ramures chez les cervidés, ou l'endométriome chez la femelle des mammifères. Au-delà de ces phénomènes physiologiques, tous les animaux peuvent réparer les dégâts liés aux blessures ou aux maladies. Depuis la cicatrisation jusqu'à, pour certaines espèces, la reconstruction de parties entières de leur corps : patte, queue, rétine, cœur, morceaux de cerveau, etc. Tous ces phénomènes peuvent être rassemblés sous le terme de régénération. Je me restreindrai ici aux membres et à la queue (c'est-à-dire au tube nerveux). Je serai volontairement succinct renvoyant le lecteur intéressé au cours de 2009.

Origine des cellules du blastème

Les champions de la régénération des membres sont les tritons et les salamandres (urodèles) ; plus l'axolotl, forme larvaire et aquatique de l'amblystome, mais sexuellement mature (néoténie). La première étape de la régénération est la cicatrisation. Chez les mammifères, elle s'accompagne d'un processus inflammatoire et le tissu cicatriciel met fin à toute possibilité de régénération. En revanche, chez les urodèles ou les anoues au stade larvaire (têtards), la blessure ne cicatrise pas mais est rapidement recouverte d'une couche de cellules épithéliales indispensables à la régénération, l'*Apical Epithelial Cap*.

Après amputation, des signaux émanant de l'épithélium induisent la formation d'un blastème de régénération. Les cellules du blastème sont issues de cellules musculaires par un processus de fragmentation du muscle sous contrôle de deux

facteurs de transcription, retinoblastoma (un oncogène) et Msx1 (un facteur de transcription de la classe des homéoprotéines). Cette hypothèse d'un blastème totipotent dérivé de la dédifférenciation du tissu musculaire a été récemment remise en cause avec l'identification, dans le blastème, d'une mosaïque de progéniteurs déjà commis dans une voie de différenciation.

Le signal

Il me faut ici introduire les nageoires des poissons. Les nageoires pectorales sont les équivalents évolutifs des membres des tétrapodes et la nageoire caudale correspond à la queue de ces mêmes tétrapodes. Le poisson zèbre ou zébrafish, modèle le plus courant, a l'avantage d'être facilement accessible aux approches génétiques et de biologie cellulaire. La régénération de sa nageoire caudale est un modèle particulièrement populaire du fait de la simplicité de la lésion.

Les nageoires régèrent en 10 à 14 jours après amputation. L'épiderme se reforme rapidement (en 1 jour) à la suite de migrations cellulaires. Le blastème se forme ensuite par migration de cellules mésenchymateuses. Le blastème semble divisé en trois domaines ; un domaine distal de cellules quiescentes, un domaine plus proximal de cellules en prolifération et un domaine proximal en cours de différenciation. L'innervation est nécessaire à la formation du blastème et, une fois le blastème formé, intervient dans sa croissance et dans la création du pattern approprié. Plusieurs facteurs d'origine neurale ont été proposés, mais rien n'est clair à ce niveau là.

Les voies FGF et Wnt sont indispensables à la régénération. Wnt agit en amont du FGF, mais certains Wnts (Wnt5) sont inhibiteurs, ce qui suggère une régulation de la croissance par les voies non-canoniques. Pendant les jours 2 à 4, la croissance est forte avec accélération des divisions cellulaires et un début de formation du cartilage des rayons. D'autres morphogènes sont impliqués (acide rétinoïque,...) dont les fonctions ont été détaillées dans le cours.

Pour continuer avec le fil de la voie Wnt, la surexpression d'un inhibiteur de cette voie affecte la régénération du membre chez l'axolotl. Le Xenope est un modèle particulièrement intéressant car il perd sa capacité de régénération entre les stades 50 et 58. L'amputation au stade 51 est suivie d'une régénération bloquée par un inhibiteur des Wnts. À l'inverse l'activation de la voie Wnt aux stades 53/54 stimule la régénération. Cette stratégie est cependant inefficace après le stade 58.

On sait depuis longtemps que la régénération des membres requiert la présence d'une innervation. L'idée est que la section du nerf entraîne la sécrétion de facteurs nécessaires à la régénération. Les axones sectionnés se rétractent après amputation puis régèrent le long des gaines de cellules gliales (cellules de Schwann) pour atteindre le blastème. Les molécules d'origine nerveuse ou produites par l'épiderme ne sont pas connues avec certitude. La piste principale implique la protéine nAG (*newt Anterior Gradient*), exprimée par les cellules de Schwann. Cette protéine conservée au cours de l'évolution permet la régénération d'un membre en l'absence de nerf, mais ce membre est aussi sans muscle. nAG agit comme facteur de

croissance et permet une morphogenèse mais il n'a pas d'action sur la croissance du nerf et ne compense pas pour les facteurs d'origine nerveuse nécessaires à la formation du tissu musculaire.

Polarité et patterning

Cette question sera discutée à partir de la régénération de queue, donc du tube nerveux, avec l'exemple de l'axolotl. Après amputation et formation de l'épithélium, le blastème nerveux se forme à partir de cellules du type glie radiaire qui, chez les vertébrés supérieurs, servent de progéniteurs capables de donner naissance à tous les types de cellules du tissu nerveux central. Ces glies se polarisent vers le bout de la queue et effectuent une transition épithélium/mésenchyme au cours de laquelle elles migrent vers la surface sectionnée pour former le tube épendymaire qui s'allonge en même temps que la queue régénère. La différenciation se produit selon une séquence rostro-caudale, le bout du tube restant indifférencié jusqu'à la fin de la régénération. Ces cellules progénitrices contribuent à la formation de plusieurs types cellulaires, y compris des neurones. Par ailleurs, le tube en régénération est entouré de cellules du blastème qui donneront les autres tissus.

Des expériences anciennes consistant à couper à travers un fragment de queue réimplanté avec inversion de l'axe DV, montrent que c'est le bout amputé qui impose sa polarité DV à l'organe en régénération, ce qui suggère que les cellules du blastème soit ont une relation de parenté avec les cellules du « moignon », soit sont naïves mais rapidement « informées par leurs plus proches voisins dans le "moignon" ».

Le tube nerveux est sous-divisé en plusieurs domaines distincts définis par une combinatoire d'expression de gènes de développement encodant des protéines à homéodomaine ou à « *paired box domains* ». En allant du dorsal au ventral, on rencontre Msx1/2 (dorsaux), Pax7 (dorsal et latéral), Pax6 (latéral), Nkx6.1 et 2.2 (ventral). La position et la taille de ces domaines sont contrôlées par des morphogènes comme Shh et les BMPs aux effets opposés. BMP4/7 activent l'expression de Msx1, Pax7 et Pax6 quand Shh a un effet inhibiteur sur ces mêmes facteurs (cours 2008). Si on pratique une amputation frontale, les cellules qui régénèrent et proviennent des glies radiaires vont-elles réinduire le patron d'expression des facteurs de transcription à partir des informations de type BMP et Shh ? Ou sont-ce les cellules qui restent en place dans les compartiments, au niveau du tronçon restant qui vont informer les cellules néoformées de leur position et donc de ce que leur destin doit être ? Quand on sait que les cellules du tube épendymaire proviennent des glies radiaires, on peut envisager qu'elles aient une mémoire épigénétique. Une autre possibilité est qu'elles acquièrent l'information positionnelle grâce à Shh et BMP, ou encore par passage intercellulaire des homéoprotéines restées exprimées dans le tissu adulte avant amputation.

Avec la régénération de la queue, nous avons commencé à aborder la question de la morphogenèse, c'est-à-dire de l'information positionnelle. Je renvoie aux cours de 2009 pour les détails concernant les complexes Hox et leur régulation, en

particulier du point de vue des marquages épigénétiques pour me concentrer sur la question des morphogènes exprimés chez l'adulte, leur induction et leur niveau d'expression au cours de la régénération. Une première possibilité est que les cellules du blastème qui se forment après amputation se souviennent de leur position dans le membre avant amputation et que les cellules nouvellement générées « savent » quelle partie elles doivent reconstruire. Cette première hypothèse se sous-divise en deux autres possibilités. Soit les progéniteurs sont spécifiés topologiquement et prolifèrent en gardant cette information. Soit les progéniteurs sont naïfs mais récupèrent l'information des cellules en amont de l'amputation.

Si les informations de positions sont présentes dans les cellules du blastème, lesquelles ont aussi « conscience » du type de cellules qu'elles doivent donner, la notion même de cellule souche est réduite à la portion congrue puisque nos cellules sont différenciées à la nuance près qu'elles ont réacquis la capacité de proliférer. Il est donc plus probable que le blastème est non différencié mais rapidement différencié sous l'influence de morphogènes. Ces morphogènes peuvent répondre au modèle de diffusion de type BMP ou Shh ou venir du tissu en amont suite à l'amputation. Dans le premier cas, cela suppose que les morphogènes sont toujours exprimés, ou réinduits par l'amputation. Dans le deuxième cas cela implique que l'information de position (combinatoire de facteurs de transcription, essentiellement des homéoprotéines ou HPs) est toujours présente ou rapidement réinduite par l'amputation. Pour cette deuxième stratégie, il faut évidemment envisager un mécanisme de passage de cette information depuis le morceau resté en place vers le morceau en croissance.

En effet, même si les cellules nouvellement générées savent d'où elles partent (le moignon exprimant un marqueur positionnel), elles doivent aussi être capables d'adopter les positions manquantes. Il faut donc à la fois une composante de mémorisation de la position et une composante de plasticité nécessaire à l'acquisition d'une nouvelle information positionnelle. Si je suppose, comme cela semble être démontré, que la zone de prolifération est comprise entre une zone distale quiescente et une zone proximale de différenciation, alors l'adoption de l'information adéquate répondrait au principe d'intercalation, les cellules adoptant progressivement les valeurs intermédiaires entre le site d'amputation et le site distal auxquels je peux attribuer par convention les valeurs 100 et 0.

Une idée populaire fournit une solution alternative qui est que la position des cellules du blastème, au moment de la coupure, détermine le niveau approprié d'expression d'un morphogène et que ce morphogène, sa nature et sa concentration, instruit les nouvelles cellules en remodelant la structure de leur chromatine. Il faut donc accepter que le génome, contrairement à ce qui a si souvent été avancé, n'est pas une structure à une dimension qui se projette sur une structure à 4 dimensions (espace plus temps), mais bien une structure elle-même à 4 dimensions comprenant des informations spatiales et temporelles. Si on ne peut pas jouer sur l'espace, il faut donc jouer sur le temps, si on veut régénérer, alors il faut se résoudre à rajeunir (malgré les risques sur lesquels je reviendrai en 2010). Il reste que ce « rajeunissement » doit être local et limité dans le temps.

Oublions un instant la nécessité de la formation d'une zone de croissance, c'est-à-dire d'une interaction épithélium-mésenchyme qui est la marque de tous les bourgeons. Oublions aussi la formation du blastème, c'est-à-dire de cellules souches totipotentes ou au potentiel limité (une mosaïque de cellules souches commises dans des directions différentes). Et concentrons-nous sur l'existence (maintien) d'une information de position chez l'adulte en adoptant l'idée que le renouvellement est la règle et que la physiologie s'inscrit dans un double mouvement de mort et de création organique.

Pour que l'information de position (combinatoire d'expression de facteurs de transcription, HPs) préside à ce renouvellement continu, il faudrait qu'elle soit maintenue en permanence par un gradient (ou 2 ou n) de morphogènes qui traverserait, pour ainsi dire, le membre en passe d'être amputé. Ce n'est pas impossible, mais il semble plus raisonnable de penser que cette information est fixée de façon épigénétique et n'est pas dépendante, pour sa pérennité, d'un flux de morphogène diffusant de façon permanente entre source et puys.

Si je compare un blastème naturel (développement) et un blastème régénératif, le blastème en développement est dans un état dynamique alors que le blastème en régénération doit retrouver un état dynamique. Reprenons le blastème en développement et partons de l'hypothèse que c'est le temps passé dans la zone de progression qui est important. Ce temps se traduit par l'expression d'une combinatoire d'HPs (A,B,C au temps t et A,B,C,D au temps $t + \Delta t$). Puis A,B,C,D,E, etc. (je fais défiler l'alphabet au fur à mesure que le temps s'écoule).

L'hypothèse est qu'en fin de croissance, hors donc de la période dynamique, ces différentes combinaisons sont fixées épigénétiquement. La deuxième hypothèse est que si je coupe entre la zone ABC et ABCD, soit je suis capable de reformer une zone de progression (des cellules souches), soit je ne le suis pas (chez un oiseau ou un mammifère par exemple). Supposons l'axolotl qui le peut. Alors comment ces cellules de cette nouvelle zone de progression vont-elles « sentir » le temps ? Une possibilité est que le gradient de morphogène diffusant de la source au puys (mais notons que le puys a disparu du fait de l'amputation !) soit toujours là. Une autre est que les facteurs ABC ou un produit X (ou plusieurs) régulé(s) par la combinatoire ABC puisse informer les cellules souches de leur proximité avec ABC. Cela revient à inverser la flèche du temps.

On ne s'étonnera pas, étant donné la théorie des HPs comme morphogènes, que je propose que ces marqueurs épigénétiques soient toujours présents chez l'adulte et capables de diffuser dans le blastème, de l'instruire de sa position ou, si l'on veut, car c'est la même chose, de l'inversion du temps. Cette hypothèse permet de scinder notre problème en deux parties et de poser trois questions. Question 1 : les HPs sont-elles exprimées chez l'adulte selon un schéma qui traduit l'histoire du développement ? (À quel moment ai-je été généré ?). Question 2 : si un blastème se forme (poisson ou axolotl), est-il informé (et comment) et peut-il reprendre le cours du temps ? Question subsidiaire 3 à diviser en deux sous-questions 3a et 3b : (3a) si un blastème ne se forme pas (vertébrés supérieurs) pourquoi ? (3b) et que puis-je

faire pour induire un blastème ? Clairement la réponse à 3b dépendra de ma compréhension de 3a. C'est tout l'enjeu de ce qu'on appelle médecine régénérative.

Commençons donc par la question 1 : les HPs sont-elles exprimées chez l'adulte selon un schéma qui traduit l'histoire du développement ? La réponse est clairement oui. Cette expression adulte pourrait correspondre à une connaissance, pour les cellules, de leur position dans l'organisme achevé mais d'autres fonctions spécifiquement adultes sont possibles et même probables. Cette expression pourrait avoir des effets contradictoires sur la régénération. D'une part, elle est nécessaire à la formation du tissu approprié, de l'autre, l'impossibilité d'effacer cette information pourrait constituer un obstacle à la formation de cellules souches et à la régénération. Ce qui signifie que la question de l'épigénèse ne peut pas être séparée de celle de la formation du blastème, puisque faire un blastème, c'est modifier le marquage épigénétique du tissu.

Rappelons que l'épigénèse correspond à la fixation d'un caractère (algorithme de gènes exprimés) et à la pérennité de cette fixation, même au travers de la prolifération cellulaire. Cette stabilité repose sur des modifications chimiques stables de la structure de la chromatine. Par exemple, la méthylation des îlots CpG, et les modifications (méthylation, acétylation et phosphorylation) des histones, protéines qui « habillent » l'ADN.

La comparaison systématique de l'expression génétique dans des fibroblastes prélevés en différents sites anatomiques (humain) confirme que ces cellules ont des patrons d'expression distincts, reflétant leur position dans le corps. Je résume : l'expression différentielle des gènes des complexes homéotiques HOXA et HOXD reflète la localisation de la cellule sur l'axe PD des membres supérieurs et postérieurs. Celle des gènes du complexe C est en corrélation avec la position AP et celle des gènes du complexe B est plutôt associée avec l'origine des organes internes.

Ce maintien de l'identité positionnelle chez l'adulte résiste à la mise en culture sur plus de 35 générations cellulaires, ce qui démontre l'existence d'une mémoire épigénétique puissante. On peut interpréter cette stabilité dans le cadre de la fonction la plus évidente de l'expression adulte des HOX : l'homéostasie cellulaire. Les cellules de l'épiderme sont remplacées régulièrement et doivent savoir où elles se trouvent pour fabriquer la peau appropriée (par exemple poilue sur le dessus et glabre sur le dessous de la main).

Cette régionalisation homéotique n'est pas restreinte aux fibroblastes, on la retrouve dans de nombreux tissus, musculaires, adipeux, cartilagineux, osseux, etc. Notons que cette régionalisation ne reproduit pas forcément celle qui opère au cours du développement. Il reste qu'il y a une information positionnelle et que cette information est remarquablement stable.

En conclusion, ce qui caractérise l'état adulte est, au-delà de la prolifération des cellules, une stabilité de la situation établie au cours du développement. Cette stabilité est évidemment importante pour l'homéostasie du système. Elle permet aux nouvelles cellules de connaître leur position par rapport à celles qui sont restées en place, même s'il est possible que cette stabilité aille à l'encontre d'une régénération chez certains organismes, les vertébrés en particulier.

Il reste que les cellules nouvellement formées, soit sont vierges de toute information positionnelle et doivent en acquérir une adéquate, soit ne sont pas vierges et ont une marque positionnelle tout en étant capables de modifier cette identité pour fabriquer une région manquante du membre. Cette question de la virginité positionnelle des cellules souches adultes et de la stabilité de cette information, si elle est présente, est centrale dans l'étude des processus régénératifs.

Cellules souches

On peut donc proposer de considérer les cellules du blastème prolifératif comme des cellules souches dans lesquelles l'information épigénétique de position et de lignage, portée par un certain nombre de gènes de développement, doit être effacée puis reconstruite dans la zone de différenciation. Si la prolifération est sous le contrôle de l'interaction épithélium/mésenchyme, la reconstruction dans la zone de différenciation qui implique un marquage épigénétique est, c'est une hypothèse, sous celui des cellules positionnées en amont de l'amputation. Cette information provient, je le pense, de cibles contrôlées par les facteurs de transcription de la zone restée intacte, en particulier les HPs, lesquelles, en tant qu'elles sont des morphogènes, sont d'excellentes candidates pour cette fonction de re-spécification.

Si les salamandres peuvent le faire, pourquoi pas nous ? Un élément de réponse est l'absence, chez les vertébrés supérieurs, de production locale de cellules souches pluripotentes capables de former un blastème. C'est pourquoi nous allons aborder le thème des cellules souches, en particulier les cellules souches pluripotentes induites (iPS) en nous concentrant essentiellement sur les mammifères.

Il a fallu attendre 1983 pour que soit générée une souris par transfert d'un noyau d'œuf dans un œuf énucléé, prouesse technique du fait de la taille de l'œuf de souris. En 1997, c'est le clonage de Dolly par transfert d'un noyau de cellule de glande mammaire (après passage en culture) dans un œuf énucléé. Depuis Dolly, d'autres mammifères ont suivi le chemin : souris, vaches, chèvres, cochons, lapin et même un chat. Le taux de succès est de 1 %, comme chez les amphibiens. L'étape suivante (nous sommes en 2003) était donc de rechercher dans le cytoplasme les molécules et les mécanismes de cette reprogrammation.

Avant d'en arriver là, rappelons brièvement les étapes précoces du développement et les différentes techniques de reprogrammation utilisées jusqu'en 2006, année de naissance des iPS. Après fécondation, l'œuf diploïde se divise pour donner la blastula composée de plusieurs cellules probablement identiques. La première différenciation visibles sépare le trophoctoderme de la masse cellulaire interne (*Inner Cell Mass*, ICM). Le trophoctoderme fournira les annexes embryonnaires, dont le placenta, alors que l'ICM donnera l'embryon au sens propre. Les cellules de l'ICM ou, un peu plus tardivement de l'épiblaste, mises en culture, donnent les cellules ES (*embryonic stem cells*) ou cellules souches embryonnaires.

Avant 2006 les techniques de reprogrammation étaient au nombre de 4 :

1. reprogrammation par transfert nucléaire ;
2. reprogrammation par fusion cellulaire ;

3. reprogrammation par extraits cellulaires ;
4. reprogrammation par « explantation cellulaire ».

Ces différentes technologies de reprogrammation nucléaire ont leurs avantages et inconvénients. Le transfert nucléaire est peu efficace, la fusion des cellules avec des cellules ES peut permettre de reprogrammer le noyau étranger mais les caryotypes sont anormaux. L'addition d'extraits cytoplasmique de cellules pluripotentes ne permet pas la reprogrammation, mais est utile pour des études biochimiques. Finalement, la mise en culture est très peu efficace et limitée aux cellules germinales.

La question de base est simple : le génome peut-il être reprogrammé ou est-il, dans certaines cellules altéré de façon irréversible ? Sans revenir à la vision de Weismann, ce que nous savons des recombinaisons des gènes des immunoglobulines ou de l'existence d'éléments mobiles (rétrotransposons) autorise à se poser la question.

À l'inverse des approches classiques, la technologie iPS n'implique pas un passage par la blastula, mais la seule expression d'un cocktail de quatre facteurs de transcription par des cellules différenciées mises en culture. C'est pourquoi les travaux rapportant la fabrication des iPS ont été immédiatement reconnus comme une avancée considérable dans le problème de la reprogrammation épigénétique. En effet, la seule expression de quatre gènes (Oct4, Sox2, c-Myc et Klf4) encodant des facteurs de transcription est suffisante pour redonner une totipotence complète à des fibroblastes de queue de souris.

De nombreux points doivent cependant être résolus avant d'envisager des applications thérapeutiques. Le premier point est la mutagenèse éventuellement associée à l'intégration des gènes. Une deuxième question est celle de la dangerosité possible de ces cellules reprogrammées. Même si elles sont plus tard redifférenciées, la survie d'un pourcentage infime de cellules tumorales est possible, voire probable. Il reste que cela indique dans quelle direction chercher : la compréhension du mécanisme épigénétique. Il reste que les iPS sont d'ores et déjà utilisées pour développer des modèles cellulaires de certaines maladies génétiques à partir de cellules prélevées chez des patients. À terme, l'idéal sera de reprogrammer *in vivo* et localement, ce qui ne semble pas constituer un objectif irréaliste.

Dans les premières expériences, le taux d'induction était inférieur à 0,05 %. Cette faible fréquence demande une explication. Dans le modèle élitiste seulement quelques cellules sont reprogrammables (avant ou après induction). Dans le modèle stochastique, toutes peuvent le faire mais seulement un petit pourcentage le fait et le choix résulte du hasard. Le modèle élitiste suppose une compétence avant l'introduction des 4 facteurs. Le raisonnement n'est pas absurde mais n'exclut pas le modèle stochastique.

Sans entrer dans les détails, le modèle le plus populaire est un modèle stochastique fondé sur les étapes de modifications épigénétiques nécessaires à la reprogrammation. Les 4 facteurs permettraient d'induire l'état de totipotence pour presque 100 % des cellules mais cette « remontée » vers un état totipotent serait instable et suivie d'une « redescende », à moins que les cellules ne soient bloquées dans la position « cellule souche » ce qui nécessite, au moins, que les 4 *loci* endogènes soient

pleinement activés. Un élément essentiel est une méthylation appropriée de l'ADN. En effet, les régions promotrices de plusieurs gènes de la pluripotence sont fortement méthylées dans les cellules différenciées, mais sont hypométhylées dans les cellules ES et les iPS.

La reprogrammation en iPS repose aussi sur les modifications des histones. Dans les cellules ES et iPS les histones H3 et H4 sont hyperacétylées au niveau des promoteurs de gènes « associées » à l'état pluripotent, état qui favorise la transcription de ces gènes. Au contraire, les cellules différenciées ont des H4 hypoacétylées. Les méthylations des histones sont aussi de grand intérêt. Dans les cellules ES et les iPS, H3 est méthylée sur la lysine 4 et déméthylée sur la lysine 9 au niveau des promoteurs des gènes de pluripotentialité. Les fibroblastes présentent un « *pattern* » de méthylation inverse. Ce qu'il y a de plus étonnant est que dans les cellules ES, comme dans les iPS, on a un *pattern* de double méthylation sur les lysines 27 (inhibition) et 4 (activation) de H3, et que ce *pattern* doit être présent pour générer des iPS. Bref, sans revenir sur les détails du cours, la formation des iPS est une question de reprogrammation épigénétique stable de la chromatine.

Pour finir, il me faut introduire le gène Nanog. Après fertilisation, les œufs des mammifères produisent, par division cellulaire, deux lignages extra-embryonnaires, le trophoblaste et l'hypoblaste. Cette phase préparatoire est suivie de la création d'une population de cellules pluripotentes constituant l'épiblaste à partir duquel l'embryon se forme dans son entier (mais pas les annexes embryonnaires). Nanog est une HP hautement divergente exprimée dans les cellules embryonnaires pluripotentes.

Il était donc extrêmement surprenant de ne pas trouver Nanog dans le quatuor « magique » de la reprogrammation des fibroblastes en iPS. Cependant le niveau d'expression de Nanog est très faible dans les cellules qui ne sont pas complètement reprogrammées ou manquent à activer les gènes endogènes de la « *stemcellness* » (les 4 gènes introduits artificiellement induisent leur propre expression au niveau génomique). De plus l'expression de Nanog permet d'enrichir en cellules susceptibles de participer à la formation de chimères et de passer dans la lignée germinale. On peut donc supposer que Nanog n'est pas indispensable aux étapes précoces de la reprogrammation, mais joue un rôle dans le passage d'un stade Pre-iPS au stade iPS. C'est l'idée d'une reprogrammation progressive avec passage par un stade critique qui a été discutée pendant le cours.

Je n'y reviens pas et saute directement à la conclusion majeure de cette discussion qui est que la difficulté principale, dans un contexte thérapeutique, n'est peut-être pas la capacité à pousser la régénération, mais la difficulté de trouver l'équilibre entre réparation et formation de tumeurs du fait de l'obligatoire dérégulation des systèmes de contrôle de la prolifération anti-oncogène.

Ces choses étant établies, nous pouvons passer au chapitre de l'usage des iPS dans les recherches sur les pathologies. Modéliser des maladies humaines, dans des systèmes en culture est un des bénéfices attendus des iPS. Ces cellules peuvent être générées par la transduction des 4 gènes Oct4, Klf4, Sox2 et c-Myc. Typiquement les cellules sont récupérées chez les patients à partir de biopsies ou de prélèvements sanguins.

La plupart des phénotypes pathologiques ne sont observés que dans des lignages spécifiques, pas dans les cellules souches. Il est donc nécessaire de générer des cellules différenciées à partir des cellules souches. Des protocoles de différenciation ont déjà été mis au point pour certains types cellulaires. C'est ainsi qu'ont été générées des cellules souches neurales, des motoneurones, des neurones dopaminergiques, des cellules de la rétine, des hépatocytes, des adipocytes, des cellules endothéliales, des cellules sanguines et des fibroblastes. Ces protocoles sont inspirés des travaux en embryologie qui permettent de comprendre les mécanismes qui sous-tendent dans les situations « normales » le développement des différents types cellulaires.

Un des problèmes évidents de cette « modélisation » *in vitro* est le temps pris pour le développement des maladies *in vivo* et le contexte tissulaire de l'émergence de la maladie. Si on considère, par exemple, la maladie d'Alzheimer ou celle de Parkinson, il est clair que, même dans leurs formes génétiques, la latence d'apparition *in vivo* peut prendre plusieurs dizaines d'années. Il en est de même pour la maladie de Huntington qui apparaît rarement avant 40 ans en dépit de son caractère monogénique.

Une des façons de « mettre les pendules à l'heure » est de soumettre les cellules à des stress, par exemple un stress oxydatif. Il reste que la cinétique de la maladie n'est pas forcément facile à récapituler *in vitro*. Une autre difficulté peut résider dans la pureté du lignage, alors que l'histoire développementale et les interactions tissulaires peuvent évidemment jouer un rôle important dans le développement de la pathologie. Plus généralement des maladies avec un fort composant épigénétique seront difficiles à reproduire dans la mesure où les iPS sont justement déprogrammées et reprogrammées sur le plan épigénétique. Cela disqualifie, en tout cas pour l'instant, cette approche pour les maladies sporadiques ou multifactorielles, ce qui représentent la grande majorité des cas.

Dans le même ordre d'idée se pose la question des lignées-contrôles. En effet la variabilité interindividuelle suggère qu'il est préférable de prendre comme contrôles des cellules dérivées de la fratrie. Mais même entre membres d'une même fratrie l'hétérogénéité génétique est un élément important à prendre en compte. D'où les 4 « défis technologiques » majeurs posés par la « médicalisation » des iPS :

1. la création ou reprogrammation d'iPS sans introduire de modifications génétiques qui pourraient altérer l'intérêt du matériel généré ;
2. l'utilisation de stratégies génétiques dont le but est de générer des marqueurs de différenciation ou de correction génétique ;
3. l'induction de phénotypes pathologiques *in vitro* ;
4. l'induction de phénotypes pathologiques *in vivo*.

Ces quatre points ont été discutés cette année et je n'y reviens pas sauf pour rappeler que malgré ces *caveat* de nombreux progrès ont déjà été accomplis, en particulier dans la modélisation de maladies monogéniques et autonomes cellulaires. Pour ces maladies, mais aussi pour les autres, de nombreux travaux fondés sur ces approches essentiellement cellulaires ont permis d'explorer l'intérêt thérapeutique de petites molécules, de protéines thérapeutiques, et de la génomique fonctionnelle pour

comprendre les mécanismes morbides et développer des thérapies essentiellement fondées, à ce jour, sur le remplacement cellulaire.

Je vais maintenant clore ce résumé en illustrant ces généralités par deux exemples de l'utilisation de ces cellules iPS induites à partir de cellules humaines, ceux de la dysautonomie familiale et de la maladie de Parkinson.

La dysautonomie familiale est une maladie génétique fatale liée à une mutation dans une protéine IKBKAP associée au complexe I-kappa-B, une kinase de fort intérêt physiologique. Cette mutation résulte d'un défaut d'épissage tissu-spécifique conduisant à des niveaux variables de molécules dépourvues de l'exon 20. Des iPS ont été fabriquées à partir de fibroblastes de patients puis différenciées en cellules des précurseurs de la crête neurale. Cette fabrication nécessite un certain nombre d'étapes et des connaissances fondamentales sur le développement embryonnaire, consistant à connaître les facteurs de croissance et/ou de transcription (pour faire simple) conduisant de l'œuf à la crête neurale. À partir de ces cellules et des cellules issues d'iPS-contrôles, un certain nombre de gènes dont l'expression est modifiée chez les cellules dérivées de patients ont été identifiés, ce qui a permis de caractériser les propriétés moléculaires et cellulaires des cellules affectées par cette modification de l'épissage.

Un des buts de la création de ces cellules est aussi de donner des outils pour le criblage de médicaments. À partir de ces cellules un criblage pharmacologique a permis l'identification de drogues rectifiant l'épissage de IKBKAP.

On aura compris qu'un des goulots d'étranglement est la capacité de différencier les iPS dans le sens désiré et donc la compréhension des étapes de différenciation qui se succèdent dans l'embryon. J'illustrerai cela à partir des neurones dopaminergiques mésencéphaliques (mDA), en particulier ceux de la substance noire qui dégénèrent au cours de la maladie de Parkinson.

Je renvoie au cours de l'année 2008 pour rappeler que les neurones mDA se développent à l'avant de la frontière Mes/Met au point de rencontre des homéogènes Otx2 et Gbx2 dans ce que nous pouvons considérer comme une niche sensible aux facteurs *sonic hedgehog* et FGF8.

On ne s'étonnera donc pas si ce sont ces facteurs qui ont permis d'obtenir des populations de neurones enrichies en neurones mDA susceptibles d'être greffés dans la substance noire des patients à partir desquels ces neurones ont été générés (ce sont leurs fibroblastes qui ont été reprogrammés) donc avec un risque faible de rejet par le système immunitaire. Ce pourcentage de cellules est relativement faible (autour de 5 %) et des étapes supplémentaires d'enrichissement sont donc souhaitables. Quant à l'utilisation de ces cellules pour des études pharmacologiques, une étape de vieillissement des cellules pourrait s'avérer indispensable. Nous retombons là sur un point discuté plus haut dans le cadre des « considérations générales ». Sans sous-estimer une autre difficulté, celle de permettre aussi la croissance des axones vers les noyaux du striatum innervés par les neurones mDA. Évidemment on peut greffer ces cellules directement dans le striatum pour fournir de la DA localement. C'est une opération qui aura des effets mais qui fait l'impasse sur les régulations fines permises par une véritable reconstruction de la voie dopaminergique.

Il ne faut pas non plus éluder la lourdeur et les dangers d'un protocole forcément très invasif. Le fin du fin serait de reprogrammer les cellules localement en infusant les éléments permettant cette déprogrammation/reprogrammation à partir des cellules en place en espérant que soient présents sur place et de façon endogène les éléments qui faciliteraient une telle reprogrammation. Il n'aura pas échappé, je pense, qu'une telle stratégie dépasse le cadre de la maladie de Parkinson et pourrait aussi être envisagée pour des désordres nés, non seulement d'une dégénérescence, mais aussi d'une lésion mécanique.

C'est sur cette question ouverte, que je reprendrai le cours de l'année prochaine

RÉFÉRENCES PRINCIPALES DU COURS

- Amabile G., Meissner A., *Trends Mol Med*, 15, 2009 (Feb), 59.
 Banito A., *et al.*, *Genes Dev*, 23, 2009 (Sep 15), 2134.
 Belmonte J.C., Ellis J., Hochedlinger K., Yamanaka S., *Nat Rev Genet* **10**, 878 (Dec), 2009.
 Birnbaum K.D., Sanchez Alvarado A., *Cell*, 132, 2008 (Feb 22), 697.
 Boland M.J., *et al.*, *Nature*, 461, 2009 (Sep 3), 91.
 Bosch T.C., *Dev Biol*, 303, 2007, (Mar 15), 421.
 Briggs R., King T.J., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 38, 1952 (May), 455.
 Brugges J.P., Kumar A., *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 2008, 525.
 Broun M., Gee L., Reinhardt B., Bode H.R., *Development*, 132, 2005 (Jun), 2907.
 Cai C. *et al.*, *Nat Cell Biol*, 11, 2009 (Jan), 56.
 Coates M.I., Jeffery J.E., Rut M., *Evol Dev*, 4, 2002 (Sep-Oct), 390.
 Daley G.Q., *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 17, 2007.
 Ebert A.D., *et al.*, *Nature*, 457, 2009 (Jan 15), 277.
 Echeverri K., Tanaka E.M., *Dev Biol*, 279, 2005 (Mar 15), 391.
 Fan Y., Bergmann A., *Trends Cell Biol*, 18, 2008 (Oct), 467.
 Forsthoefel D.J., Newmark P.A., *Curr Opin Genet Dev*, 19, 2009 (Aug), 412.
 Graf T., Enver T., *Nature*, 462, 2009 (Dec 3), 587.
 Guder C., *et al.*, *Oncogene*, 25, 2006 (Dec 4), 7450.
 Gurdon J.B., Byrne J.A., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2003 (Jul 8), 8048.
 Gurley K.A., Rink J.C., Sanchez Alvarado A., *Science*, 319, 2008 (Jan 18), 323.
 Hanna J., *et al.*, *Nature*, 462, 2009 (Dec 3), 595.
 Hobmayer B., *et al.*, *Nature*, 407, 2000 (Sep 14), 186.
 Hochedlinger K., Plath K., *Development*, 136, 2009 (Feb), 509.
 Jaenisch R., Young R., *Cell*, 132, 2008 (Feb 22), 567.
 Jazwinska A., Badakov R., Keating M.T., *Curr Biol*, 17, 2007 (Aug 21), 1390.
 Kawakami Y., *et al.*, *Genes Dev*, 20, 2006 (Dec 1), 3232.
 Kim D., *et al.*, *Cell Stem Cell*, 4, 2009 (Jun 5), 472.
 Kragl M., *et al.*, *Nature*, 460, 2009 (Jul 2), 60.
 Kragl M., *et al.*, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 73, 2008, 583.
 Kumar A., Godwin J.W., Gates P.B., Garza-Garcia A.A., Brockes J.P., *Science*, 318, 2007 (Nov 2), 772.
 Lee G., *et al.*, *Nature*, 461, 2009 (Sep 17), 402.

- Lengfeld T., *et al.*, *Dev Biol*, 330, 2009 (Jun 1), 186.
 Leucht P., *et al.*, *Development*, 135, 2008 (Sep), 2845.
 Li W., *et al.*, *Stem Cells*, 27, 2009 (Dec), 2992.
 MacArthur B.D., Ma'ayan A., Lemischka I.R., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 2009 (Oct), 672.
 McHedlishvili L., Epperlein H.H., Telzerow A., Tanaka E.M., *Development*, 134, 2007 (Jun), 2083.
 McKinnon P.J., *Nat Rev Neurosci*, 10, 2009 (Feb), 100.
 McNeil P.L., Kirchhausen T., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 2005 (Jun), 499.
 Oviedo N.J., Beane W.S., *Semin Cell Dev Biol*, 20, 2009 (Jul), 557.
 Park I.H., *et al.*, *Nature*, 451, 2008 (Jan 10), 141.
 Pellettieri J., Sanchez Alvarado A., *Annu Rev Genet*, 41, 2007, 83.
 Petersen C.P., Reddien P.W., *Science*, 319, 2008 (Jan 18), 327.
 Petersen C.P., Reddien P.W., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2009 (Oct 6), 17061.
 Ramalho-Santos M., *Cell*, 138, 2009 (Aug 21), 616.
 Reddien P.W., Sanchez Alvarado A., *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 2004, 725.
 Rinn J.L., *et al.*, *J Invest Dermatol*, 128, 2008 (Apr), 776.
 Rossant J., *Cell*, 138, 2009 (Sep 18), 1047.
 Scadden D.T., *Nature*, 441, 2006 (Jun 29), 1075.
 Schafer M., Werner S., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 2008 (Aug), 628.
 Silva J., *et al.*, *Cell*, 138, 2009 (Aug 21), 722.
 Soldner F., *et al.*, *Cell*, 136, 2009 (Mar 6), 964.
 Soshnikova N., Duboule D., *Science*, 324, 2009 (Jun 5), 1320.
 Stoick-Cooper C.L., Moon R.T., Weidinger G., *Genes Dev*, 21, 2007 (Jun 1), 1292.
 Takahashi K., Yamanaka S., *Cell*, 126, 2006 (Aug 25), 663.
 Tanaka E.M., Weidinger G., *Nat Cell Biol*, 10, 2008 (Feb), 122.
 Technau U., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2000 (Oct 24), 12127.
 Wang K.C., Helms J.A., Chang H.Y., *Trends Cell Biol*, 19, 2009 (Jun), 268.
 Yamanaka S., *Nature*, 460, 2009 (Jul 2), 49.
 Zarzeczny A., *et al.*, *Cell*, 139, 2009 (Dec 11), 1032.
 Zhao X.Y., *et al.*, *Nature*, 461, 2009, (Sep 3), 86.
 Zhou H., *et al.*, *Cell Stem Cell*, 4, 2009 (May 8), 381.

SÉMINAIRE

Le séminaire a été tenu à l'École polytechnique fédérale de Lausanne sous la forme de quatre cours et d'une conférence :

17 février 2010 : *Definition of protein transduction, some classical examples, cell biological issues raised by protein transduction.*

18 février : *Possible solutions to the question of how to travel across a membrane, the development of transduction peptides, biotechnological applications.*

25 février : *The animal homeoprotein case, known in vivo functions of this mode of transduction.*

3 mars: *Second messengers, translation regulation, open issues regarding this mode of signal transduction.*

4 mars : *Évolution des systèmes de signalisation.*

RECHERCHE

Patterns et migrations cellulaires

Nous avons cette année laissé de côté l'étude du rôle du transfert intercellulaires de homéoprotéines (HP) dans le déplacement des bords entre domaines D/V du tube nerveux pour nous concentrer sur le rôle du Pax6 extracellulaire dans la migration, chez le poulet entre E3 et E6, des cellules exprimant Olig2, qui sont à 80 % des précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs). En collaboration avec l'équipe de Jean-Léon Thomas, nous avons démontré par perte et gain de fonction, *in vitro* et *in vivo* que Pax6 extracellulaire est nécessaire à la migration des OPCs. Nous explorons actuellement l'hypothèse d'une interaction avec les voies de signalisation impliquant la *netrin*.

Sur la question des *patterns*, en collaboration avec l'équipe de Florence Maschat, nous avons démontré que la sécrétion d'*Engrailed* au niveau antérieur de la frontière A/P du disque imaginal de l'aile de drosophile, induit la formation de la veine antérieure transverse et que cette induction par *Engrailed* extracellulaire passe par une interaction avec la voie DPP.

Guidage des axones

Le guidage des axones peut être vu comme une forme de migration cellulaire restreinte au cône de croissance. Nous avons démontré que l'internalisation d'*Engrailed* par les cônes de croissance des cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs) placés dans un gradient de cette HP attire les cônes nasaux vers la source du l'HP et repousse les cônes temporaux. Cette activité contrastée reflète la situation *in vivo* et le patron de projection des RGCs sur le toit optique (mésencéphale dorsal) du poulet. Nous avons depuis vérifié que les deux protéines *Engrailed-1* et *Engrailed-2* (En1/2) sont exprimées en gradient A/P à la surface des cellules du toit optique et que le blocage du *Engrailed* extracellulaire *in vivo* induit une modification du *pattern* d'innervation du toit optique par les fibres des RGCs. Dans ce même travail nous avons démontré qu'*Engrailed* produit son effet de guidage en synergie avec la voie des Ephrins.

L'action d'En1/2 dans le guidage demande une régulation locale de la traduction de protéines. Parmi les cibles traductionnelles identifiées, plus de la moitié correspond à des messagers mitochondriaux qui entourent les mitochondries et sont traduits localement. Cela nous a amené à constater que l'internalisation d'En1/2 est suivie par une synthèse et sécrétion d'ATP. En suivant l'action d'En1/2 sur le collapse des cônes de croissance temporaux, nous avons démontré que l'action synergique d'En1/2 avec la voie des Ephrins passe par une hydrolyse de cet ATP sécrété et la fixation de l'Adénosine sur des récepteurs purinergiques de type AR1.

Période critique

En 2008 nous avons démontré que l'ouverture de la période de plasticité corticale pour la vision binoculaire chez la souris est induite par l'internalisation de l'HP Otx2 par les interneurons inhibiteurs (GABAergiques) exprimant la parvalbumine (cellules PV). En fait, l'internalisation d'Otx2 est nécessaire et suffisante pour ouvrir à P20 la période critique et la clore 20 jours plus tard. Une observation curieuse est que l'infusion d'Otx2 dans le cortex visuel résulte en l'internalisation spécifique de cette HP par les cellules PV. C'est en étudiant ce point que nous avons démontré qu'Otx2 se fixe spécifiquement sur des glycosaminoglycans (GAGs) exprimés par les cellules PV. Nous avons identifié le domaine d'Otx2 qui interagit avec ces sucres. Infusés *in vivo*, ces peptides réduisent fortement l'internalisation d'Otx2 par les cellules PV. La conséquence de cette inhibition est une réouverture de la plasticité corticale chez l'adulte.

Une autre ligne de recherche consiste à identifier l'origine de l'Otx2 internalisé par les cellules PV. Nous avons des arguments en faveur de sources multiples, la rétine certes, mais aussi le plexus choroïde et, peut-être, la glande pinéale.

Enfin, nous avons muté dans Otx2 deux acides aminés qui sont nécessaires à la reconnaissance des cellules PV et généré, en collaboration avec l'équipe d'Antonio Simeone, une souris Knock-in dont le gène Otx2 a des capacités de transfert réduites. Nous analysons actuellement leur phénotype.

Études sur un modèle murin de glaucome

Nous avons montré que la protéine Otx2 est un facteur de survie pour les neurones ganglionnaire de la rétine (RGCs) qui dégénèrent dans le glaucome. La capacité d'Otx2 à favoriser la survie des RGCs *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de lésion mécanique (rupture des axones adulte) ou chimique (NMDA) a été établie. Ce sauvetage des RGCs *in vivo* s'accompagne d'une protection totale de la vision. Nous sommes en train d'étudier les mécanismes impliqués dans ce sauvetage et d'identifier ses cibles (transcription et traduction) impliquées.

Études sur un modèle murin de la maladie de Parkinson

Les gènes *En1/2* sont exprimés dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques (mDA). Chez les mutants *En1-/+*, les neurones mDA meurent progressivement. Cette mort est bloquée par l'infusion et l'internalisation par les neurones de la protéine *En1* (ou *En2*). Afin de vérifier si nous avons là un modèle possible de maladie de Parkinson (PD) nous avons étudié et démontré la protection de neurones mDA contre l'intoxication par les toxines rotenone et MPP+/MPTP. Nous avons démontré que cette protection s'accompagne d'une récupération des niveaux normaux de dopamine striatale et de la récupération d'un comportement moteur normal. La voie impliquée a été identifiée. Les protéines *En1/2* régulent la traduction locale des protéines *Ndufs1* et *Ndufs3* qui entrent dans la composition du complexe I mitochondrial touché par les deux toxines. Bloquer spécifiquement

la synthèse de *Ndufs1* antagonise l'effet protecteur d'*En1/2*. Finalement, nous avons eu la surprise de constater que l'infusion d'*En1* (et son internalisation) stimule l'activité physiologique de la voie nigro-striée, en absence de lésion.

Autres travaux

En dehors de l'équipe Prochiantz, la chaire abrite deux équipes indépendantes dirigées, l'une par Sophie Vríz, professeur à Paris 7 et l'autre par Alain Joliot, directeur de recherche au CNRS.

Sophie Vríz et ses collègues travaillent sur la régénération dans le modèle du poisson-zèbre. Ils ont mis au point, en collaboration avec des chercheurs des départements de chimie (Ludovic Jullien) et physique (David Bensimon de l'École normale supérieure), des technologies permettant de faire du traçage et d'exprimer des transgènes dans les poissons à un niveau de précision unicellulaire. Cela permet de comprendre l'origine des cellules du blastème de régénération (voir résumé du cours 2009) et d'en modifier les propriétés. Par ailleurs, ils ont découvert que bloquer l'apoptose a un effet négatif sur la régénération et, à partir de cette observation, ils s'efforcent de caractériser les signaux impliqués dans la mise en route des programmes de régénération.

Alain Joliot et son équipe travaillent sur la transduction protéique en suivant la sécrétion et l'internalisation de deux familles de protéines modèles, les FGF et les homéoprotéines. Ils ont découvert un site intracellulaire de fixation sur la membrane plasmique qui semble réguler à la fois le transport à travers la membrane et l'adressage intracellulaire des HPs. Ce site est constitué du PIP2 membranaire ce qui conforte l'idée que la signalisation par les homéoprotéines est synergique d'autres voies de transduction, ici celle des Inositol phosphate. Par ailleurs, cette équipe continue de travailler sur la vectorisation de substances pharmacologiques à travers la membrane plasmique, et aussi, les épithéliums à jonctions serrées, dont la barrière hémato-encéphalique.

PUBLICATIONS 2009-2010

Wizenmann A., Brunet I., Lam J., Sonnier L., Beurdeley M., Zarbalis K., Weisenhorn-Vogt D., Weinl C., Dwivedy A., Joliot A., Wurst W., Holt C.* & Prochiantz A.* (*co-senior authors), « Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo », *Neuron*, 64, 2009, 355-366.

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, 2009, 40.

Aubry S., Burlina F., Dupont E., Delaroche D., Joliot A., Lavielle S., Chassaing G., Sagan S. 2009 « Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides », *Faseb J* 23, 2956-2967.

Bouzaïfour M., Dufourcq P., Lecaudey V., Haas P., Vríz S., « Fgf and Sdf-1 pathways interact during zebrafish fin regeneration », *PLoS ONE*, 4(6), 2009, e5824.

Rampon C., Bouzaffour M., Ostuni M., Dufourcq P., Girard C., Freyssinet J.M., Lacapere J.J., Schweizer-Groyer G., Vrız S., « Translocator protein, TSPO (18kDa) is involved in primitive erythropoiesis in zebrafish », *FASEB J.*, 23(12), 2009, 4181-92.

Sinha D., Neveu P., Gagey N., Aujard I., Benbrahim-Bouzi C., Le Saux T., Rampon C., Gauron C., Goetz B., Dubruille S., Baaden M., Volovitch M., Bensimon D., Vrız S., Jullien L., « Photocontrol of protein activity in cultured cells and zebrafish with one- and two-photon », *ChemBioChem*, 11(5), 2010, 653-663.

Sinha D., Neveu P., Gagey N., Aujard I., Le Saux T., Rampon C., Gauron C., Kawakami K., Leucht C., Bally-Cuif L., Volovitch M., Bensimon D., Jullien L., Vrız S., « Photo-activation of the CreERT2 recombinase conditional site-specific recombination with high spatio-temporal resolution », *Zebrafish*, 7(2), 2010, 199-204.

Bouzaffour M., Rampon C., Ramaugé M., Courtin E., Vrız S., « Differential effect of thyroid hormones during regeneration in zebrafish », *Gen Comp. Endo*, 168, 2010, 88-94.

BREVETS

Prochiantz A., Beurdeley M. & Di Nardo A., Polypeptides d'adressage spécifique à des cellules cibles d'Otx2, 19 janvier 2009, n° FR 09/00217.

PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS 2009-2010

- Neurocultures workshop, February 20-22, 2009, Berlin, Germany
- International Conference on Innovative Research in Autism, April 15-17, 2009, Tours, France, Keynote lecture.
 - Celebrating Darwin, April 27- May 2, 2009, Les Treilles, France.
 - 3rd Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules, from Bench to Bedside, August 31th - September 2nd 2009, Montpellier, France, Keynote lecture.
 - ARVO International Society for Ocular Cell Biology, September 9-12, 2009, Ericeira, Portugal, Keynote lecture.
 - Jacques Monod Institute Inaugural Colloquium, October 20th 2009, Paris, France
 - Baxter Lectures, Il futuro di Darwin, November 27-28, 2009, Pisa, Italy.
 - Les Génomes, les arbres, l'évolution moléculaire, November 30th, 2009, Strasbourg.
 - How to build the Dopamine System, December 2nd 2009, Utrecht, NL.
 - Cavailles-Lautman-Canguilhem : Le Concept, l'Être, La Vie, Ecole normale supérieure, 22 et 23 janvier 2010.
 - Neurobiology : from molecules to systems, February 8-9, 2010, Montpellier, France.
 - The 1st Symposium for the Global Research Laboratory (GRL), Program of Korea, February 23rd, 2010, Seoul, South-Korea.
 - Imaging Brain Plasticity, April 1-2, 2010, Paris, France.
 - WE-Heraeus Seminar on Biophysics of Membrane-Active Peptides, April 11-14, 2010, Bad Honneff, Germany, Keynote lecture.