

QUE SOMMES-NOUS ? CE QUE NOUS APPREND LA GENETIQUE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.

PH MIKAELOFF

Avant de me consacrer à la chirurgie cardiaque, j'ai pratiqué pendant plus de 10 ans la chirurgie expérimentale opérant de nombreux animaux aussi divers que des petits rats de 250 à 300 grammes, plusieurs centaines de chiens, des porcs, des babouins et quelques veaux. Dès les années 1960 j'étais frappé par les similitudes entre l'anatomie de ces divers animaux et le corps humain. Mais à l'époque je ne m'expliquais pas pourquoi. Les découvertes récentes de la génétique moléculaire du développement embryonnaire nous ont apporté des réponses fascinantes. Je vais essayer d'aborder sous un éclairage particulier ce que nous sommes en réalité, ancrés dans l'évolution des êtres pluricellulaires. Un nombre limité de gènes placés de façon contigue sur les chromosomes dirigent en cascade le développement embryonnaire de la mouche drosophile. Ils ont été découverts dans les années 1980, donc récemment. Or il a été mis en évidence que pratiquement les mêmes gènes agissent sur le développement embryonnaire de tout le monde animal y compris les êtres humains. Je rappelle qu'un gène est un segment d'ADN lequel est le dépositaire de l'information génétique. Ce sont les gènes qui sont responsables de la fabrication des protéines dans les cellules au cours du développement embryonnaire et durant la vie. Or on sait maintenant que chez l'homme il y a seulement 23 000 gènes codant pour des protéines qui occupent moins de 2% du total de l'ADN.

D'abord un rappel sur la structure et la fonction de l'ADN : L'ADN, acide désoxyribonucléique est un acide nucléique constitué d'une série de nucléotides qui comportent eux-mêmes un manche constitué par un sucre le désoxyribose et un groupement phosphate auquel est rattachée une base azotée. L'ADN est porteur de 4 bases azotées complémentaires 2 à 2, l'Adénine appariée à la Thymines et la Guanine appariée à la Cytosine qui se réunissent par des liaisons hydrogènes.

Ces liaisons sont à l'origine de la structure en double hélice de l'ADN doté d'une grande stabilité. L'alternance des 4 bases azotées explique que l'information détenue par l'ADN est un alphabet de 4 lettres ATGC. L'ADN est donc le dépositaire de l'information génétique et se condense sous forme de chromosomes dans le noyau de chaque cellule. On désigne sous le nom de génome l'ADN total d'une cellule, toutes les cellules d'un organisme étant pourvues du même génome.

Comment l'ADN transmet-il l'information génétique ? En fait seule une petite partie de l'ADN dite codante qui représente moins de 2% du génome est constituée de gènes de structures qui codent pour des protéines. Un gène est donc un segment d'ADN : Au total chez l'homme il y a environ 23 000 gènes. Les gènes par un processus complexe dit de transcription, après séparation des deux brins d'ADN sous l'action d'une enzyme l'hélicase donnent naissance dans le noyau cellulaire aux molécules d'acide ribonucléique dit pré messenger dont la séquence des bases azotées donc l'information génétique est dictée par celle des gènes. Donc cet ARN pré messenger est une copie du gène. Il comporte des portions codant pour une protéine surnommée exons et des portions non codantes les Introns qui forment des boucles visibles en microscopie électronique. Un processus biochimique dit d'épissage excise les Introns et raccorde entre eux les Exons pour donner l'ARN messenger. En outre un processus dit d'épissage alternatif peut éliminer des portions d'exons donc aboutir à des ARN messagers différents : Epissage et épissage alternatif commun à tous les eucaryotes ont constitué une voie importante d'évolution des gènes. Ils expliquent qu'un gène puisse donner naissance à plusieurs protéines et donc comment l'homme avec ses 23 000 gènes est capable de produire plus de 100 000 protéines différentes.

L'ARN messager est ensuite transporté à travers la membrane nucléaire dans le cytoplasme au niveau des ribosomes, organites universels des cellules vivantes visibles au microscope électronique qui ont pour fonction de sceller les liaisons peptidiques entre les 20 acides aminés du monde vivant, donc de fabriquer des chaînes protéiques par le processus dit de traduction : Pour ce faire l'ARN messager se déplace à travers le ribosome comme une bande magnétique dans un lecteur de cassette. La lecture du message codé se fait par le déplacement de triplets de bases azotées surnommés Codons fixés sur l'ARN messager. Chaque codon correspond à un acide aminé précis. Il existe donc un tableau des correspondances entre les 20 acides aminés du monde vivant et les codons de l'ARN messager qui portent le nom de code génétique. Le ribosome fait avancer l'ARN messager codon par codon tandis qu'un acide ribonucléique dit de transfert est chargé d'amener au ribosome les acides aminés précis selon un triplet de bases azotées complémentaires d'un codon qu'on surnomme les anticodons. Ainsi s'effectuent de proche en proche dans les ribosomes les multiples synthèses de chaînes protéiques. Ces chaînes protéiques fabriquées à partir des 20 acides aminés qui sont extrêmement nombreuses jouent un rôle crucial au cours du développement embryonnaire et ensuite durant la vie cellulaire. Elles constituent la structure de tous les tissus et organes. Elles assurent aussi de multiples fonctions notamment hormonales et enzymatiques. Chez les vertébrés la structure des protéines est très voisine par exemple entre le chimpanzé et l'homme ces structures diffèrent seulement par 1 ou 2 acides aminés pour chaque protéine. Il est surprenant que le ver Nématode *Caenorhabditis Elegans* qui comporte moins de 1000 cellules ait le même nombre de gènes codant que l'homme. C'est dire toute l'importance des mécanismes complexes de la régulation de l'expression des gènes qui a été mise en évidence récemment : elle explique les différences dans le développement des êtres pluricellulaires.

Il y a quelques années on pensait que la plus grande partie de l'ADN n'avait pas de fonction. C'est pourquoi on le surnommait ADN poubelle. On s'est rendu compte récemment que l'essentiel de l'ADN a en fait une fonction essentielle dans cette régulation de l'expression des gènes. On l'appelle donc ADN non codant : Il est à l'origine de milliers de protéines régulatrices de l'activité des gènes qui se fixent sur des segments d'ADN pour les activer ou les inhiber. L'ADN non codant est à l'origine de toute une série d'acide ribonucléique, les microARN et ARN interférents qui bloquent également la transcription des ARN messagers ou leur traduction. La régulation de l'expression des gènes est donc fondamentale pour expliquer le développement embryonnaire, la différenciation des divers tissus et organes et donc la spécificité des cellules dont nous reparlerons. En dépit de la grande diversité de forme et de taille, tous les organismes pluricellulaires partagent pratiquement les mêmes gènes et les mêmes mécanismes de signalisation moléculaire. Cela est vrai pour des espèces aussi différentes que les insectes et les vertébrés. Il existait déjà au moins 80% des gènes de l'homme dans l'ancêtre commun des vers des insectes et des hommes. Moins de 10% de ces gènes sont consacrés au développement embryonnaire. Le développement embryonnaire est une succession d'évènements commandés par le génome, les gènes régulateurs du développement qui interviennent en cascade. Prenons d'abord l'exemple du développement d'un petit ver transparent le Nématode *C. Elegans* long de 1 mm qui a pu être suivi en détail à partir de son génome qu'on a séquencé : on connaît donc le mécanisme moléculaire de son développement. Chez ce petit ver qui comporte au total 959 cellules le devenir de chaque cellule est connu ainsi que le développement détaillé de son système nerveux. Son embryogénèse dure seulement 16 heures et peut être entièrement observé in vitro.

Au niveau moléculaire beaucoup des mécanismes du développement de ce petit ver sont semblables à ceux des insectes et des vertébrés et dépendent de gènes analogues. En effet des groupes de gènes sont activés en cascade y compris des gènes de mort cellulaire dont nous reparlerons. Dans les années 1980 l'étude du développement de la mouche *Drosophile* qui a transformé notre compréhension de la façon dont les gènes gouvernent le développement de l'embryon a montré que la plupart des gènes qui contrôlent l'organisation du corps de la *Drosophile* se retrouve chez les vertébrés et donc chez l'homme. La *Drosophile* nous a donc fourni les clés pour comprendre la génétique moléculaire de l'embryon humain. Le développement de la *Drosophile* a été particulièrement étudié pour plusieurs raisons : Sa durée de vie courte de 10 jours, la nature de ses chromosomes de grande taille et réduit à 8 ce qui se prête bien à des manipulations génétiques. En 1995 l'attribution du Prix Nobel de Médecine à Christine Nusslein-Volhard, Eric Wieschaus, Edward Lewis a couronné plus de 20 ans de leurs recherches sur le contrôle génétique du développement embryonnaire de la *Drosophile*. Au départ l'ovocyte de la *Drosophile* est pourvu d'un cytoplasme d'origine maternelle dont les constituants sont répartis de façon inégale. Cet œuf est le siège de divisions de ces noyaux et forme un syncytium avec ses multiples noyaux. Le cytoplasme de ce syncytium contient des ARN messagers et des protéines d'origine maternelle de concentration inégale : Ils sont à l'origine du début de la segmentation de l'œuf en délimitant la région antérieure, postérieure et dorsale d'une larve en quelques heures. Ensuite interviennent en cascade 3 groupes de gènes de segmentation qui divisent l'embryon en une série de bandes et déterminent l'axe céphalo-caudal : Successivement les gènes gap qui déterminent les grands blocs de l'embryon, les gènes pair-rule qui interviennent dans l'organisation segmentaire et les gènes de polarité segmentaire qui contrôlent l'organisation de chaque segment. Enfin entrent en jeu les gènes homéotiques ou gènes architectes qui organisent la structure du corps.

Ces gènes chez la drosophile sont localisés de façon contigue sur le chromosome 3 et s'expriment successivement selon leur ordre de localisation. Ainsi le complexe antennapedia comporte 5 gènes qui dirigent la structure de la tête et des deux premiers segments thoraciques. Le complexe bithorax comporte 3 gènes qui organisent la structure de la région postérieure du second segment thoracique, du 3^{ème} segment thoracique et des segments abdominaux. Entre le complexe antennapedia et bithorax est intercalé un long segment d'ADN non codant à l'origine de protéines régulatrices de ces gènes. Les gènes de l'axe antéro-postérieur se retrouvent dans tout le règne animal : Les vertébrés et l'homme possèdent eux 4 groupes de gènes homéotiques qu'on surnomme gènes Hox, localisés sur 4 chromosomes. Ces gènes Hox s'expriment d'avant en arrière sur l'embryon selon le principe de la colinéarité temporo-spatiale. Que ce soit chez la Drosophile la souris ou l'homme les gènes s'expriment de façon corrélée avec leur localisation chromosomique comme le montre ce schéma. Ces gènes sont pratiquement identiques des insectes aux vertébrés : Donc on estime qu'ils ont eu un ancêtre commun il y a environ 600 millions d'années, comme le montre l'étude des ARN des ribosomes. L'évolution animale s'est faite par toute une série de duplications de ces gènes homéotiques. Au total un petit nombre de gènes environ une centaine qui agissent en cascade contrôlent le développement de la mouche Drosophile. Donc les gènes Hox des vertébrés organisent la formation de l'axe du corps. Or on a mis en évidence l'intervention de gènes cycliques dans la formation d'avant en arrière des segments de l'axe vertébral, surnommés somites selon une horloge de segmentation. Chez l'embryon de poulet le cycle pour la formation de chaque somite est de 90 mn. Le mécanisme de cette horloge biologique est un rétrocontrôle négatif : Un gène cyclique code pour une protéine régulatrice qui inhibe sa propre expression. Cette protéine elle-même se dégrade ensuite et l'activité du gène reprend de façon cyclique.

Abordons maintenant la génétique du tout début du développement embryonnaire de la souris à l'homme : Un être pluricellulaire commence sa vie sous forme d'une cellule unique : c'est le génome de cette cellule qui va déterminer tout le développement embryologique. Tous les embryons vertébrés passent par les mêmes stades de développement : L'ovocyte fécondé est une cellule dite totipotente car elle peut produire toutes les cellules de l'organisme. Son cytoplasme contient des ARN messagers et protéines régulatrices de gènes d'origine maternelle. Il se divise en cellules sphériques identiques ou blastomères : Jusqu'au stade de 8 blastomères les cellules restent totipotentes, donc capables d'exprimer la totalité du génome. A partir du stade de 16 blastomères l'aplatissement des cellules périphériques donne à l'œuf un aspect lisse et prend le nom de Morula ce qui signifie petite mure avec 2 types de cellules : Des cellules périphériques à l'origine du Trophoblaste et des cellules centrales à l'origine de l'embryon. Ces dernières sont devenues pluripotentes et ne pourront donc que se différencier vers des tissus spécifiques. Le développement embryonnaire des cellules centrales de la Morula se poursuit par la gastrulation que l'on observe chez tous les vertébrés malgré des différences entre les espèces. Celle-ci commence par l'invagination de cellules à un stade où l'embryon ne comporte qu'une seule couche de cellules. A la fin de la gastrulation l'embryon comportera 3 feuillets cellulaires : le feuillet externe ou ectoderme, le feuillet intermédiaire ou mésoderme et le feuillet interne ou endoderme. Après la gastrulation les 3 feuillets cellulaires sont engagés dans la voie de la différenciation car ils comportent 3 lignées de cellules différentes. L'une des conséquences est la formation d'un cylindre de cellules mésodermiques qu'on surnomme la corde dorsale issue du nœud de Hensen qui détermine la ligne médiane antéro-postérieure donc l'axe principal de l'embryon.

Au 19^e siècle la conception du développement embryonnaire était épigénétique : On pensait que l'embryon se construisait par adjonction successive de structures, chacune nécessaire au développement de la structure suivante. Avec l'essor de la génétique cette conception a fait place à une embryogénèse contrôlée par l'expression d'une cascade de gènes spécifiques du développement. Donc l'embryon se développerait par l'application d'un programme pré établi contenu dans les gènes du développement que renferme l'ovocyte. Cependant depuis quelques années cette conception purement génétique a dû être modifiée : On a mis en évidence l'influence de facteurs épigénétiques au début du développement embryonnaire : La position des cellules au moment de la gastrulation active des gènes vers la différenciation. Ainsi par exemple la formation du tube neural primitif se fait à partir de l'ectoderme en fonction de la position des cellules. Il a aussi été montré que les contraintes mécaniques et les déformations subies par les tissus influencent l'expression de certains gènes du développement. On a par exemple montré que lors de la gastrulation l'invagination du futur mésoderme est produite par une accumulation de myosine, moteur moléculaire qui entraîne une contraction de la surface là où elle est concentrée. La concentration de la Myosine est sous la dépendance de gènes appelés Twist et Snail, dont l'expression est modifiée par les contraintes mécaniques.

Comment s'effectue la différenciation cellulaire au cours du développement ?

L'organisme humain comporte plus de 200 types de cellules différentes : Cette différenciation a constitué l'une des grandes énigmes de la biologie. Pendant la différenciation cellulaire des cascades de gènes sont exprimés tandis que d'autres sont réprimés. C'est un arsenal épigénétique de multiples protéines spécifiques qui régule cette différenciation :

Ces protéines se fixent sur des séquences d'ADN, au niveau desquelles elles activent ou inhibent le gène. Ces protéines régulatrices sont interchangeable entre des espèces très différentes, mouche ou souris par exemple. En fait l'ADN impacté dans les chromosomes des cellules est enroulé autour de protéines qu'on appelle les Histones sur une longueur d'environ 150 nucléotides formant un collier lui-même compacté pour former la chromatine. Avant qu'un gène soit transcrit la chromatine doit subir une dissociation afin de rendre une portion d'ADN accessible. Ces modifications dites épigénétiques, la phosphorylation l'acétylation la méthylation des histones déterminent l'activation ou la répression des gènes. L'ADN lui-même peut subir une méthylation moyen de réprimer l'expression des gènes : La méthylation de la cytosine par la 5 méthylcytosine. La mémoire de la spécialisation cellulaire, quand les cellules se divisent ensuite repose sur des boucles de rétro contrôles positifs: La protéine A est une protéine régulatrice de gènes qui active sa propre transcription et donc perpétue sa propre synthèse. Cette mémoire expérimentalement persiste sur les cellules mises en culture. Une seule protéine régulatrice de gènes peut coordonner l'expression d'un ensemble de gènes et les activer. Ainsi sont engendrés divers types de cellules spécialisées au cours du développement. Il existe toute une série de protéines de signalisation intercellulaire conservées au cours de l'évolution animale qui guident la différenciation cellulaire et permettent la communication entre les groupes de cellules. On peut citer les voies WNT, TGF, Hedgehog et Notch qui interviennent tout au long de l'embryogénèse Par exemple la voie Notch intervient dans le développement du système nerveux des vertébrés.

A partir du bourgeon embryonnaire d'un membre chez le poulet les protéines Hedgehog dictent le développement de ce membre. Le développement de plus en plus complexe d'un membre ou d'un organe se fait donc par induction séquentielle des cellules différenciées.

L'apoptose ou mort cellulaire génétiquement programmée est une composante importante du développement embryonnaire car elle permet de créer des vides dans le plan du corps ou d'éliminer des cellules qui présentent un défaut : Par exemple les espaces interdigitaux sont liés à la mort de cellules situées entre les doigts des mains. Au cours du développement du système nerveux l'apoptose joue un rôle important car elle éliminera les neurones dépourvus de connexions fonctionnelles. Chez l'homme on estime que la moitié des neurones sont ainsi éliminés au cours de l'embryogénèse. Les mécanismes de l'apoptose ont été étudiés : Elle peut être déclenchée par deux voies différentes soit à partir de la surface cellulaire soit à partir des mitochondries. Dans toutes les cellules animales ce sont des enzymes protéolytiques appelées caspases qui effectuent la lyse des cellules. Les gènes qui contrôlent l'apoptose au cours du développement ont d'abord été identifiés chez le ver Nématode *C. Elegans* dont nous avons parlé. Le nombre de cellules qui meurent au cours du développement de ce ver est toujours le même 131 sur les 959 cellules que comportent les vers adultes sous l'action de 3 gènes identifiés. Une seule protéine régulatrice de gènes peut même déclencher la formation d'un organe entier. C'est le cas de l'œil. Chez la *Drosophile* le gène *Ey* produit une protéine régulatrice qui déclenche l'expression d'une cascade de 7 gènes pour former l'œil. Expérimentalement l'expression forcée du gène *Ey* dans un autre territoire tel que les pattes conduit à la formation d'un œil ectopique.

Au cours de l'évolution animale la formation des yeux repose sur le même groupe de gènes appelés Pax6 chez les vertébrés alors que l'œil composé des insectes a fait place à l'œil de type caméra des vertébrés.

Abordons maintenant la commande génétique du développement du système nerveux central chez les vertébrés : Comme le reste du développement embryonnaire le système nerveux central suit un schéma conservé au cours de l'évolution animale caractérisé par une polarité céphalo-caudale et dorso-ventrale. La neurulation débute dès la 3^{ème} semaine par la formation du tube neural primitif à l'origine du système nerveux central. La corde dorsale d'origine mésodermique envoie à l'ectoderme situé au dessus d'elle en position dorsale des signaux inducteurs qui entraînent la différenciation d'une partie des cellules ectodermiques en cellules précurseurs du tissu nerveux. Ces cellules forment un épaississement sur la ligne médiane ou plaque neurale, développement directement lié à leur position. C'est la position des zones du futur tissu nerveux qui déterminera leur spécialisation par expression différente des gènes. Cette plaque se déprime en gouttière dont les lèvres se fusionnent sur la ligne médiane pour donner à la fin de la 4^{ème} semaine le tube neural primitif. Cette fermeture du tube neural est multifactorielle : Elle dépend de l'expression de plusieurs gènes comme SHH et Pax. Elle est également liée à des facteurs humoraux comme le cholestérol et l'acide folique. Le tube neural présente une organisation à la fois crânio-caudale et dorso-ventrale. L'organisation crânio-caudale se caractérise par la croissance privilégiée du pôle céphalique et l'apparition de subdivisions transversales qu'on appelle les neuromères sous l'action d'un groupe de gènes les gènes OTX et GBX. Simultanément 3 inflexions délimitent 3 territoires contigus : le proencéphale ou cerveau antérieur, le mésencéphale ou cerveau moyen et le rhombencéphale ou cerveau postérieur. Chacun de ces territoires est subdivisé en neuromères.

L'invention par la nature du tube neural a été fondamentale pour l'évolution du système nerveux jusqu'à celui de l'homme, car il a permis l'augmentation progressive de la surface cérébrale, donc des capacités cognitives. Homo sapiens a ainsi acquis 2m² de surface corticale, évolution liée aux duplications des gènes homéotiques du système nerveux. Malheureusement pour l'homme l'évolution des capacités morales ne s'est pas faite parallèlement aux capacités cognitives, si bien que nous vivons dans un monde chaotique. Comment un simple tube de cellules précurseurs peut-il produire une telle diversité de structures cérébrales ? C'est l'organisation en unités du tube neural ou neuromères qui a permis récemment de répondre à cette question. Nous avons vu que ce processus de segmentation se retrouve sur les embryons de toutes les espèces animales au début du développement. Les gènes homéotiques chez la drosophile, les 4 groupes de gènes Hox chez les vertébrés mettent en place les segments distincts qui donneront la tête le thorax et l'abdomen. Or dans les années 1980 on a établi une correspondance entre cette segmentation embryonnaire et les débuts du développement cérébral par l'existence de ces neuromères sous l'action de gènes homéotiques, par exemple les gènes Otx1 et Otx2 pour le développement du cerveau antérieur. Cette organisation crânio-caudale est sous la dépendance de l'expression des gènes Shh, Wnt et Fgf8 qui organisent des territoires précis. Ultérieurement le proencéphale se divisera en téléencéphale et diencephale d'où dériveront le thalamus et l'hypothalamus. L'organisation dorso-ventrale du tube neural à commande génétique met en place des territoires fonctionnels : L'aire motrice, l'aire sensitive et les ventricules cérébraux. La neurogénèse est intense pendant les 3 premiers mois : Chez l'embryon humain les 12 premières semaines il se forme à chaque minute près de 250 000 nouveaux neurones.

Mais simultanément l'apoptose sous commande génétique permet la régulation régionale des neurones et l'on estime qu'au moins la moitié des neurones meurent au cours de l'embryogénèse chez l'homme.

En conclusion le développement des êtres humains est étroitement intégré dans celui de tous les êtres pluricellulaires y compris les insectes. Un petit nombre de gènes sont impliqués dans l'embryogénèse. L'essentiel des différences entre les êtres pluricellulaires réside dans les mécanismes complexes de la régulation de l'expression des gènes : c'est pourquoi plus de 98% de l'ADN lui est consacré. Cette prise de conscience de ce que nous sommes biologiquement nous amène à nous concevoir ainsi qu'à envisager autrui sous un jour tout à fait nouveau.

