

## BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION

JULES HOFFMANN  
Président de la section

JACQUES PRADEL  
Rapporteur

Claude Antony  
Roger Augier  
Gilles Boeuf  
Jean-Claude Boucaut  
Hervé Bouhin

Daniel Boujard  
Amand Chesnel  
Anne Ciolek-Figiel  
Yves Combarrous  
Anne-Marie Duprat  
Bernard Fournier  
Jean-Noël Hugues

Nathalie Josso  
Jean-Antoine Lepasant  
Michel Philippe

Dominique Royere  
Patricia Simpson  
Marie-France Sire

La biologie du développement et de la reproduction a connu au cours de la dernière décennie un renouveau spectaculaire. Les problèmes fondamentaux étudiés pendant la première moitié de ce siècle, ce qu'il est convenu d'appeler l'âge d'or de l'embryologie expérimentale, ont trouvé ou sont en voie de trouver une réponse. L'essor considérable pris durant les quatre ou cinq années écoulées se mesure à différents points. Dans tous les grands pays de recherche, des "opérations structurantes" ont été menées, et nombre de grands laboratoires (nationaux en Europe, européens et américains) ont orienté leur activité vers la biologie du développement. Le mouvement, vers ces laboratoires, de chercheurs, de post-docs et d'étudiants issus des meilleures filières de formation va en s'accéléralant. Les meilleurs périodiques (Cell, Nature, Science ou Embo J.) publient de plus en plus d'articles de la discipline ; dans le même ordre d'idée, il n'y a probablement pas d'exemple de montée en puissance aussi rapide que celui du très bon journal qu'est devenu Development. Jamais, de fait, la biologie du développement n'a connu une telle expansion, jamais la conjoncture scientifique n'a été plus favorable aux découvertes dans ce domaine fondamental, véritable plaque tournante des Sciences du Vivant.

Le renouveau de la biologie du développement et de la reproduction est aussi sensible en France qu'à l'étranger. De très bons laboratoires, soutenus par CNRS comme par l'INSERM ou l'INRA,

couvrent la plupart des thèmes de grande expansion évoqués dans ce rapport. Notre objet n'est pas d'en dresser une liste ni de relever les disparités qui peuvent exister, mais d'insister sur le fait que leur contribution a été et reste essentielle, parfois décisive, dans les avancées qu'a connues la discipline, considérée au plan international. Les thèmes qui, dans le champ couvert par l'actuelle section 28 du Comité national, ont connu les développements les plus significatifs sont les suivants :

- mécanismes du développement (définition des axes, inductions, patron morphogénétique, neurogenèse, développement système immunitaire...);

- contrôle génétique du développement (gènes architectes, cascades génétiques...);

- contribution maternelle au développement précoce ;

- évolution (universalité des mécanismes ; biodiversité) ;

- contrôle du cycle cellulaire, de la mort cellulaire au cours du développement ;

- reproduction (gamétogenèse, maturation ovocytaire).

D'autres thèmes, développés dans des laboratoires rattachés à la section 28, sont plutôt mieux couverts par d'autres sections : Génome (section 23) ; Endocrinologie (25) ; Maladies génétiques (23) ; Plasticité neuronale (25) ; Mécanismes du cycle cellulaire (24, 25) ; Évolution (30, mais aussi 28) ; Biologie des organismes (30, et aussi 28).

Il est important d'insister sur un point. Il est de plus en plus évident que les grands mécanismes du développement (et les molécules) ont été largement conservés au cours de l'évolution. Aussi les résultats obtenus sur les différents systèmes modèles concourent-ils de manière synergique au progrès des connaissances. Dit autrement, la biologie du développement tient beaucoup de sa force du fait de l'utilisation de systèmes modèles divers. En corollaire, apprécier correctement non seulement la conjoncture, mais surtout la qualité des projets et

des travaux menés dans cette discipline, nécessite le regroupement et la coordination (la mise en cohérence) des "compétences". Concernant l'organisation de la communauté scientifique, et plus précisément le Comité national, on doit regretter, parce que c'est dommageable, que de nombreux laboratoires qui produisent d'excellents travaux en biologie du développement (sur différents modèles, incluant des modèles végétaux) ne sont pas rattachés à la section 28. Il est plus que souhaitable que ces équipes et laboratoires le deviennent.

Ce rapport ne concerne pas l'ensemble des disciplines couvertes par la section 28. Deux thèmes qui ont connu des avancées considérables ont été sélectionnés pour ce qui concerne la biologie du développement, trois pour la biologie de la reproduction.

## **1 - LA CONJONCTURE EN BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT**

### **1. 1 GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT**

La génétique du développement a pour objectif la dissection génétique et moléculaire des mécanismes mis en jeu pendant l'ontogenèse. Sa démarche première consiste en l'identification et l'étude fonctionnelle de molécules jouant un rôle clé dans ces mécanismes. Cette discipline a pris un essor décisif à la suite d'une série de découvertes essentielles (dont celles, déjà anciennes couronnées par le prix Nobel 1995) qui ont amené à la formulation de véritables "concepts génétiques" :

- Existence de gènes dont la seule fonction est de contrôler certaines étapes du développement. Citons par exemple les gènes homéotiques (Hox) qui définissent l'identité des différentes parties du corps de l'organisme, ou encore les gènes neurogéniques responsables de la ségrégation des pré-curseurs et des lignages neuronaux ou gliaux.

- Subdivision de grandes étapes du développement en “opérations” élémentaires. Pour exemples, les cascades génétiques qui permettent la mise en place des polarités axiales et la définition des unités métamériques (les segments) de l'embryon.

- Partition des unités morphogénétiques en “compartiments” définis génétiquement.

Ces grandes découvertes ont, pour l'essentiel, été réalisées sur le modèle invertébré *Drosophile*. Elles ont cependant pris tout leur sens lorsqu'il est devenu avéré que le codage génétique des étapes fondamentales du développement était très largement conservé au cours de l'évolution. Ceci a permis deux avancées conceptuelles majeures. D'une part, on entrevoit dorénavant comment des mécanismes du développement peuvent être codés génétiquement. On mesure, d'autre part, à quel point les différents organismes sont des variantes du même plan de base (pas seulement au niveau des axes embryonnaires ou du patron métamérique, mais aussi au niveau de la définition des grands types cellulaires, de subdivisions majeures du système nerveux, etc.). Il apparaît donc que l'on a défini de la sorte des principes de portée générale.

Une part importante des recherches menées depuis (incluant nombre de découvertes récentes, de travaux actuels et de grandes lignes prospectives) consiste à adapter et préciser les mécanismes, mais sans en changer fondamentalement le cadre. S'il en est ainsi de beaucoup des découvertes récentes les plus significatives, bien d'autres ont été obtenues en suivant d'autres voies, en particulier par le mariage de l'embryologie expérimentale et de méthodologies de biologie moléculaire, de biologie cellulaire moderne et de génétique (en particulier sur les modèles murin, aviaire et amphibien).

## Principales découvertes récentes

- Connaissance de plus en plus précise des cascades génétiques mises en jeu lors de l'embryogenèse précoce. Elles impliquent des molécules très conservées dans l'évolution que l'on peut schématiquement ranger en deux grandes familles, des fac-

teurs de transcription et des protéines d'adressage cellulaire.

- Le complexe homéotique est conservé dans l'ensemble du règne animal (chez les végétaux le concept de l'homéose – changement de l'identité d'une partie de l'organisme après mutation – est conservé, mais pas les molécules). Il est quadrupliqué chez les vertébrés supérieurs, contient un peu plus de gènes *Hox* que le complexe de *Drosophile*, et son organisation génomique, plus contrainte, détermine le patron d'expression des gènes homéotiques, non seulement dans l'espace comme chez la mouche, mais encore dans le temps.

- L'analyse génétique (knock out, expression ectopique) de plusieurs gènes de vertébrés supérieurs codant pour des facteurs de transcription, souvent clonés sur la base d'une homologie avec des gènes de *Drosophile*, a démontré leur rôle essentiel dans le développement (*Hox*, *Pax*, *Otx*, *Krox*, *Phox*...).

- Des avancées notables ont été réalisées sur les molécules qui président aux interactions entre cellules et aux mécanismes de transduction de signal – notamment les capacités inductrices de protéines signal sécrétées comme les *Wnt*, *Hedgehog*, *FGF* ou *TGF*.

- Il convient d'insister sur les découvertes remarquables relatives à la fonction de *sonic hedgehog* et des récepteurs de l'acide rétinoïque (*RAR*, *RXR*) chez les vertébrés.

- Démonstration, dans le système des disques imaginaux de *Drosophile*, que la frontière formée entre deux compartiments devient un centre d'organisation et la source de morphogène. Le meilleur exemple est donné par les cascades impliquant respectivement les gènes (tous conservés dans l'évolution) *engrailed-hedgehog-decapentaplegic* et *serrate-Notch-Delta-wingless* (l'ordre dans cette cascade est débattu) suivant les frontières antéro-postérieure et dorso-ventrale du disque d'aile. Cette percée a levé une barrière importante entre la *Drosophile* et les vertébrés : le phénomène est entièrement analogue à une induction embryonnaire, notion chère aux biologistes des vertébrés, mais jusqu'à présent absente du langage des drosophilistes.

- Rôle de la structure de la chromatine dans la régulation de l'expression génétique au cours du développement. Citons les gènes des groupes Polycomb et trithorax et modificateurs de bigarrure (identifiés d'abord chez la *Drosophile*, puis la souris) dont les produits s'organisent en agrégats pour réguler l'activité de larges domaines de chromatine, dont les loci homéotiques ; les études menées sur l'activation du génome zygotique lors de la transition blastulienne (souris, *Xénope*) ; le mécanisme de l'inactivation du chromosome X chez les femelles mammifères ; le sceau parental ("imprinting").

- Importance de la contribution maternelle, non seulement dans les étapes précoces du développement embryonnaire, mais également dans des mécanismes plus tardifs dans lesquels jouent des gènes à expression strictement zygotique (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophile*).

- Compréhension, au niveau moléculaire, de comment peut se former une bande franche d'expression d'un gène : even-skipped bande 2 et la bande *krüppel* chez l'embryon de *Drosophile*.

- Identification de gènes qui sont à l'origine de la ségrégation des précurseurs et de la définition des lignages neurogéniques et myogéniques (*Drosophile*, vertébrés).

- Résultat aussi étonnant que leur conservation entre les espèces, les mêmes molécules régulatrices sont utilisées dans des mécanismes différents et à des étapes distinctes du développement, qu'il s'agisse autant de facteurs de transcription que de protéines signal ou de récepteurs.

## 1. 2 CONTRÔLE DE LA MORPHOGENÈSE

Les phénomènes de morphogenèse contrôlent l'établissement de la forme des organes du corps. S'inscrivent ici les interactions cellulaires conduisant à l'induction du mésoderme, puis à l'induction neurale ainsi qu'à la différenciation cellulaire, les migrations des cellules embryonnaires, les mécanismes par lesquels elles se reconnaissent et s'assemblent, le rôle des molécules de surface cellulaire et de la matrice extracellulaire dans ce processus.

De manière générale, le thème "contrôle de la morphogenèse" est très immédiatement relié au thème "contrôle génétique du développement", et l'essentiel des points abordés dans celui-ci sont à considérer pour traiter de celui-là. Par exemple, le contrôle de la morphogenèse propre à chaque unité métamérique repose sur la combinatoire de gènes *Hox* qui y sont exprimés et sur les lots de gènes cibles régulés ; même s'il n'y a pas encore d'avancée totalement significative dans ce domaine, la recherche des gènes cibles des protéines *Hox* (et d'autres molécules régulatrices) est une question de grande actualité dans le "contrôle génétique du développement".

### Principales découvertes récentes

- Des progrès importants concernant les processus d'adhésion et de migration cellulaires. Le rôle des constituants de la matrice extracellulaire, des molécules d'adhésion et des intégrines dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires, dans les remodelages tissulaires qui sous-tendent l'embryogenèse sont mieux élucidés. On commence à appréhender les réseaux d'interactions fonctionnelles entre ces molécules.

- Découverte, par les approches les plus diverses de la biologie cellulaire, de molécules (récepteurs-ligands) qui président aux interactions entre cellules et des mécanismes de transduction intracellulaire de signaux ainsi produits. Nombre de facteurs de croissance identifiés dans des cellules adultes (souvent des lignées tumorales) ainsi que les récepteurs correspondants se sont révélés être des acteurs décisifs du développement embryonnaire. Une avancée spectaculaire est que des facteurs de croissance de type fibroblastique (FGF) et transformant (TGF) sont des inducteurs du mésoderme chez les vertébrés.

- Progrès frappants dans les domaines de l'induction et de la régionalisation du tube neural et des mécanismes du guidage axonal. Ils ont été obtenus grâce à l'utilisation de modèles permettant une approche de génétique (*Drosophile*, *Caenorhabditis* et souris) ou l'expérimentation sur l'embryon (poulet et *Xénope*).

- Les cascades géniques permettant la ségrégation des précurseurs neuraux et gliaux sont en grande partie identifiés chez la *Drosophile*. L'utilisation de leurs homologues chez les vertébrés, comme marqueurs en embryologie expérimentale, a permis d'appréhender les signaux inducteurs des différentes étapes. Dans certains cas (le produit du gène *mash1* par exemple), leur rôle présumé a pu être vérifié par inactivation génique chez la souris.

- Des mécanismes moléculaires plausibles de l'induction neurale ont été mis en évidence avec deux bons candidats, *follistatine* et *noggin*, pour être l'inducteur (recherché depuis *Spemann*, les années 20).

- Trois familles de molécules ont de bonnes chances d'être les molécules de guidage essentielles des axones : les sémaphorines (*Drosophile* et vertébrés), les nétrines/*unc-6* (vertébrés/nématode) et les récepteurs tyrosine kinase *Eph* et leurs ligands, les *Elf* (vertébrés).

• Avancées très significatives sur le développement musculaire.

- Des gènes-clés contrôlant la myogenèse (famille des gènes myogéniques) ont été découverts, ainsi que certains des signaux inducteurs actifs *in vivo*.

- Des domaines très actifs concernent la régulation de gènes muscle-spécifiques étudiés par transgénèse, le contrôle de la diversification des types de fibres musculaires et l'identification de facteurs de croissance et de survie agissant sur la différenciation musculaire.

• (Re)-découverte de l'importance des processus de mort cellulaire programmée au cours du développement, et identification de gènes-clés de l'apoptose (souris, *Drosophile*).

## **1. 3 PRINCIPALES CONSÉQUENCES ET ÉVOLUTIONS NOTABLES**

• La conséquence première, de fond, est la naissance, l'émergence d'un domaine nouveau de recherche, la génétique moléculaire du développe-

ment. Avec la spécificité de ses concepts et de ses approches, elle représente aujourd'hui une des branches majeures de la biologie du développement. Au risque d'apparaître "réductionniste" par rapport à des approches plus "globales", elle tient son succès dans le fait même de disséquer les mécanismes au niveau moléculaire (par des expériences bien définies, programmables, à l'interprétation univoque), rendant plus aisée la vérification des hypothèses.

• Le cadre conceptuel défini par les grandes découvertes en quelque sorte fondatrices de la génétique du développement a été conforté par les résultats obtenus durant ces dernières années. Il continue en conséquence d'orienter les recherches actuelles. Si celles-ci ont pris un essor considérable et mobilisent un nombre sans cesse croissant de chercheurs et de laboratoires, c'est précisément parce qu'il est aujourd'hui possible d'avoir pour objectif de comprendre comment sont contrôlés génétiquement les grands mécanismes du développement (création d'asymétries, mécanismes d'induction, adressage cellulaire, équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire, etc.).

• Au-delà de leur objectif cognitif, les découvertes réalisées en biologie du développement sont d'un intérêt social et économique considérable. L'étude des mécanismes qui contrôlent la morphogenèse et des molécules effectrices impliquées dans ces processus ont amené à une compréhension meilleure des dysfonctionnements du développement associés à de nombreuses pathologies humaines (cancer, myopathies, maladies nerveuses dégénératives...). Par ailleurs, les exemples se multiplient de maladies humaines qui résultent d'altérations de gènes dont on connaît la fonction au cours du développement de modèles animaux (leucémies et autres cancers induits par le dérèglement de gènes comme les *Hox*, *trithorax*, *wnt* ou *TGF*, diabète insulino-résistant par un récepteur tyrosine kinase, etc.). Les perspectives ouvertes aujourd'hui au plan diagnostique – et ultérieurement au plan thérapeutique – constituent de réels espoirs.

• Une conséquence importante est l'apparition de nouvelles disciplines de recherche.

- Développement et évolution/développement et biodiversité. Le thème du "développement com-

paré” se pose de manière nouvelle du fait même de la conservation interspécifique des gènes-clés du développement, de réseaux géniques et des mécanismes dans lesquels ils jouent. Une série d’arguments forts et récents ont, par exemple, réactivé les hypothèses de Geoffroy St-Hilaire d’un plan de développement commun pour les arthropodes et les vertébrés. Les questions qui relèvent de ce thème restent pour l’essentiel à défricher. Elles concernent, par exemple, l’évolution des régions contrôle de gènes conservés, la co-évolution de gènes au sein de “syntagmes” ou “cassettes” (par exemple, les gènes de la réponse “immunitaire” chez la mouche et la phase aiguë chez les mammifères), les changements de connexion entre réseaux de gènes fonctionnellement reliés (par exemple, la question de l’identité des gènes cibles de gènes homéotiques, dont la batterie s’est probablement beaucoup diversifiée de la mouche au mammifère alors que le complexe Hox est si conservé, comme le sont ses régulateurs amont des groupes Polycomb et trithorax).

- Développement et biologie cellulaire. L’étude des processus de morphogenèse a pleinement bénéficié des progrès considérables réalisés en biologie cellulaire, et vice-versa. Par contre, les recherches menées en biologie cellulaire stricto sensu (sur la régulation du cycle, la polarisation, la capacité à sécréter ou à recevoir des signaux...) et en génétique du développement sont relativement peu, ou mal connectées. Ceci apparaît d’autant plus paradoxal que beaucoup des résultats les plus novateurs ont porté sur l’analyse du devenir de cellules individuelles (patron cellulaire des parasegments chez la *Drosophile*, des rhombomères chez la souris, analyses clonales). Poser l’analyse des phénotypes au niveau de la cellule et avec les outils de la biologie cellulaire devient une nécessité. Plus généralement, un objectif majeur est de comprendre comment sont connectés les mécanismes génétiques qui patronnent le développement et ceux qui régissent la dynamique du cytosquelette, les (changements de) polarités, le contrôle local de la division et de la mort cellulaires (comment, par exemple, les gènes Hox contrôlent les gènes régulateurs du cycle pour permettre la morphogenèse diversifiée des différentes parties du corps d’un animal).

- Développement et biologie structurale. L’analyse des relations structure-fonction en est à ses

début pour ce qui est des molécules du développement. Un succès remarquable a été la modélisation de l’interaction homéodomaine-ADN (RMN, cristallisation du complexe), ce qui a fait beaucoup progresser notre compréhension du mode d’action des protéines Hox. On peut prédire, pour ce qui est de l’étude des mécanismes du développement, que le champ des interactions protéine-protéine (facteur de transcription-cofacteur, récepteur-ligand...) soit encore plus vaste que celui des interactions protéine-ADN ou protéine-ARN.

Au plan des méthodes, outre l’introduction signalée plus haut de celles qui sont rodées dans d’autres disciplines, il convient de relever la panoplie d’outils génétiques qui ont été développés dans la plupart des systèmes modèles : enhancer-trap, knock-out, transposons ou virus pour faire des transgéniques et/ou étiqueter des gènes, les systèmes d’expression ectopique dirigée (ou non), d’inactivation clonale, etc.

Une voie très prometteuse se trouve dans l’utilisation d’organismes plus simples pour étudier des processus existant chez les plus complexes. La levure, par exemple, a permis de tester l’activité de gènes cdc humains, et surtout a offert un système puissant, déjà très utilisé (le système double hybride), pour étudier les interactions protéine-protéine. Si des modèles animaux comme la *Drosophile* ou le nématode *Caenorhabditis* sont d’ores et déjà utilisés pour tester l’activité de gènes d’autres espèces, on peut imaginer qu’ils offrent bientôt la possibilité d’analyser des processus propres à des animaux plus complexes.

## 1. 4 DE LA DIVERSITÉ DES MODÈLES

La progression étonnante de nos connaissances en biologie du développement a pour l’essentiel été obtenue sur un nombre réduit de modèles. Les modèles d’élection permettant à la fois une approche moléculaire et génétique sont les invertébrés *Drosophile* et *Caenorhabditis*. Chez les vertébrés, relevons le poisson zèbre, l’amphibien, l’oiseau et la souris. Le premier pourrait devenir un “équivalent” de la *Drosophile* ; le second demeure extraordinairement fécond pour l’étude de l’induc-

tion du mésoderme et du système nerveux (d'autant plus que l'œuf de Xénope est capable de synthèse protéique à partir d'ARNm étrangers injectés) ; le troisième, déjà fameux pour l'embryologie expérimentale (greffes, hybride caille/poule), se prête désormais à l'analyse génétique (virus rétroviraux) ; enfin, la mise au point de méthodes génétiques idoines (inactivation génique par recombinaison homologue, transgénèse...) a fait de la souris un modèle mammalien extraordinairement performant.

Chacun des modèles, bien sûr, présente à la fois des avantages et des inconvénients. Si la mouche permet, par exemple, une dissection moléculaire de mécanismes, elle ne se prête pas à l'embryologie expérimentale et peu aux approches cellulaires. L'analyse génétique chez la souris nécessite encore des moyens très lourds, et l'analyse est parfois rendue difficile par la complexité même du système, comme l'existence de gènes paralogues à fonction redondante. Les résultats obtenus sur ces quelques modèles ont participé de façon synergique au progrès de nos connaissances ; les données acquises sur l'un pouvant souvent être extrapolées à l'autre, du fait même de la grande conservation des mécanismes fondamentaux du développement.

Toutefois, il importe de veiller à ne pas établir de généralisation abusive en négligeant la diversité des espèces et des stratégies de développement. Par exemple, la gastrulation du Xénope se distingue de celle du Pleurodèle, bien que les bases moléculaires et cellulaires en soient les mêmes. De fait, la multiplicité des espèces constitue un potentiel important, un réservoir de modèles pour l'étude de mécanismes impossibles à appréhender sur les modèles aujourd'hui en vogue. La communauté se doit d'être suffisamment consciente de la nécessité de sauvegarder l'expertise acquise sur cette diversité de modèles biologiques, comme par exemple les invertébrés marins, les organismes se développant dans des conditions extrêmes, ou encore des organismes bien plus simples comme les protistes. Nous devons, de ce point de vue, garder en mémoire qu'il y a vingt ans, la France comptait un laboratoire leader au plan international sur le nématode *Caenorhabditis elegans*.

## 2 - LA CONJONCTURE EN BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Le poids social et économique du domaine de la reproduction pour ce qui concerne, d'une part, l'espèce humaine et, d'autre part, les espèces animales, fait que le CNRS occupe une position en retrait par rapport à l'INSERM et l'INRA respectivement. Dans ces deux organismes, les recherches finalisées (pas forcément directement appliquées) "tirent" les recherches fondamentales. Néanmoins, de très nombreux chercheurs CNRS appartiennent à des unités de ces organismes ou des universités associées ou affiliées au CNRS, et participent très activement ou dirigent des programmes importants de recherche dans le domaine de la reproduction humaine et/ou animale.

Les recherches sur la reproduction dont nous traiterons peuvent être classées en trois grandes catégories : mécanismes génétiques et épigénétiques de la différenciation sexuelle ; régulations neuro-endocrines, endocrines et paracrines des activités gonadiques ; mécanismes cellulaires de la spermatogenèse, de l'ovogenèse et de la fécondation.

### 2. 1 MÉCANISMES GÉNÉTIQUES ET ÉPIGÉNÉTIQUES DE LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

Chez les vertébrés, le sexe est déterminé génétiquement (mâleXY/femelleXX ou femelleZW/mâleZZ) ou est influencé par des facteurs de l'environnement, en particulier la température.

Dans les espèces non mammaliennes, l'implication des œstrogènes et le rôle clé de l'aromatase dans la différenciation sexuelle des gonades sont maintenant clairement établis. Chez les mammifères, l'identification du gène SRY (Sex determining Region of the Y chromosome) comme responsable de la production du Testis Determining Factor

(TDF) est une avancée majeure récente. Les mécanismes de contrôle de l'expression de SRY et les mécanismes d'action de SRY sont évidemment d'un très grand intérêt pour comprendre le déterminisme génétique du sexe. Dans ce contexte, l'étude du promoteur du gène SRY et la recherche de protéines interagissant avec SRY sont prioritaires. L'observation que SRY stimule l'expression de l'AMH (Hormone Anti-Müllerienne) qui, elle, réprime la synthèse d'aromatase, suggère que les œstrogènes pourraient également être impliqués dans la différenciation sexuelle des gonades chez les mammifères.

Les mécanismes de contrôle de la migration des cellules primordiales germinales (CPG) vers les crêtes génitales et les interactions CPG-cellules somatiques dans la morphogenèse gonadique, mâle ou femelle, sont encore largement inconnus et doivent être étudiés aux niveaux cellulaire et moléculaire.

## **2. 2 RÉGULATIONS NEURO-ENDOCRINES, ENDOCRINES ET PARACRINES DES ACTIVITÉS GONADIQUES**

Les contrôles neuro-endocrines centraux de la reproduction constituent une part importante des recherches du domaine. L'intégration, au niveau hypothalamo-hypophysaire, de paramètres externes physiques (lumière, température...) ou sociaux (partenaires sexuels, petits, congénères... ) et de paramètres internes (statuts endocrinien, nutritif...) est un élément tout à fait essentiel du contrôle de la reproduction. Cette intégration est effectuée par les neurones à GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), situés dans l'aire pré-optique et l'hypothalamus et dont l'activité, pulsative, est contrôlée par diverses afférences aminergiques et peptidergiques transmettant les effets des paramètres externes et internes cités ci-dessus. Les aspects essentiels des recherches dans ce domaine, concernent l'origine, la migration (de la placode olfactive à l'hypothalamus) et la différenciation fonctionnelle des neurones à GnRH ; les interactions morpho-fonctionnelles des neurones à GnRH et divers

noyaux neuronaux hypothalamiques et thalamiques (autoradiographie quantitative, hybridation *in situ*, microscopie confocale) ; les mécanismes d'action (directs ou non) des stéroïdes gonadiques et de la mélatonine sur les neurones à GnRH ; le mécanisme d'action du GnRH sur ses cellules-cibles gonadotropes hypophysaires (étude du récepteur, mécanismes intracellulaires d'action, biosynthèse et sécrétion des gonadotropines) ; les régulations paracrines hypophysaires. Divers aspects de ces recherches sur la reproduction sont pris en charge par des laboratoires appartenant à d'autres sections du Comité national (26, 25, 29) et constituant des interfaces intéressantes avec notre commission. En effet, plusieurs laboratoires de la section 28 sont très engagés dans ces études, tant chez les poissons que chez les mammifères.

Les contrôles endocrines des activités, gamétogénétiques et endocriniennes, des gonades des vertébrés par les gonadotropines hypophysaires sont un aspect important, étudié depuis de nombreuses années. Ce n'est que très récemment que la cristallisation d'une gonadotropine (la choriogonadotropine humaine) et la détermination de sa structure 3D permet de mieux orienter les études concernant les relations structure-activité de ces glycoprotéines très complexes. De plus, le clonage et l'expression des récepteurs de ces hormones conduit maintenant à des études beaucoup plus fines (mutagenèse dirigée) sur les régions impliquées dans l'affinité et la spécificité d'interaction hormone-récepteur ainsi que dans les mécanismes de transduction membranaire du signal hormonal et de désensibilisation des cellules-cibles. Ces études fondamentales doivent conduire à la production de nouvelles molécules gonadotropes (peptides synthétiques, hormones recombinantes) moins coûteuses et/ou plus sûres, qui seront extrêmement précieuses aussi bien en clinique humaine (PMA, contraception) qu'en zootechnie (synchronisation, super ovulation).

Les régulations endocrines gonadotropes ne s'exercent que sur les cellules somatiques gonadiques qui, secondairement, contrôlent les différentes étapes de la croissance et de la différenciation des cellules germinales. La mise en évidence et la caractérisation des facteurs paracrines, des interactions cellule-matrice extracellulaire et des contacts



intercellulaires directs impliqués dans la gamétogenèse représentent un axe important de recherche du domaine.

Des études similaires sont menées chez les invertébrés, mais l'énorme diversité de ces animaux conduit à une certaine dispersion des efforts et à un moindre degré d'avancement des travaux. Ces études doivent cependant être poursuivies pour, d'une part, exploiter au mieux la richesse des modèles au plan fondamental et, d'autre part, mieux maîtriser la reproduction de ces espèces soit pour la favoriser (aquaculture) ou pour la combattre (protection des cultures contre les ravageurs).

## **2. 3 MÉCANISMES CELLULAIRES DE LA SPERMATOGENÈSE, DE L'OVOGENÈSE ET DE LA FÉCONDATION**

Méiose et fécondation sont les deux étapes-clés de la reproduction sexuée. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces événements font l'objet d'études de plus en plus fines permettant de comprendre les mécanismes de formation des gamètes, de leur reconnaissance et de leur fusion ainsi que les étapes initiales de la constitution génétique de l'individu et de son développement précoce avant le démarrage de l'expression du génome zygotique.

Pour ce qui concerne la spermatogenèse, l'identification et les mécanismes d'action des gènes spécifiques contrôlant la balance entre multiplication spermatogoniale (mitoses) et différenciation spermatique (méiose) ainsi que l'étude des mécanismes d'action des facteurs paracrines somatiques (Sertoli, Leydig, Péri-tubulaires etc.) sur ces événements, apparaissent primordiales. Dans ce but, la réalisation de co-cultures de cellules somatiques et germinales en vue d'obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* sera extrêmement précieuse pour définir les interactions germinales somatiques impliquées ainsi que l'expression séquentielle des gènes lors des différentes étapes de la méiose. La recherche des mécanismes impliqués dans la répression du génome gamétique en relation avec

la structure de la chromatine doit ainsi pouvoir être abordée. La maîtrise des conditions de culture, de multiplication, de transfection et de différenciation des spermatogonies de mammifères domestiques permet également d'envisager des expériences de transgénèse germinale par cette voie sur ces animaux (accélération du progrès génétique, production de molécules biologiques, animaux "humanisés" pour xénogreffes).

L'ovocyte est la plus grosse cellule de l'organisme, et l'ovogenèse se déroule sur une très longue période de temps avec des stades de blocage (prophase I et métaphase II) qui peuvent être séparés de plusieurs dizaines d'années. Les mécanismes moléculaires responsables de ces blocages et de leur levée lors de l'ovulation pour le premier et de la fécondation pour le second sont au centre de la préoccupation de nombreux chercheurs de la section 28, sur divers modèles animaux (oursin, étoile de mer, Xénope, souris).

La division de l'ovocyte, contrairement à la situation générale, ne semble pas contrôlée par la croissance cellulaire. L'ovocyte présente donc une situation favorable pour aborder les questions relatives à la recombinaison génétique qui se produiront durant la méiose. C'est également un cas très particulier de régulation du cycle cellulaire puisque deux mitoses vont se suivre en l'absence de synthèse d'ADN. Les points de contrôle ("checkpoints") qui assurent d'ordinaire l'enchaînement et la succession des phases S et M sont absents ou réprimés.

En fin d'ovogenèse, la transcription deviendra nulle; un certain nombre de molécules (ARN, protéines) d'origine ovocytaire et parfois spécifiquement localisées dans cet ovocyte deviendront les éléments essentiels qui vont assurer le développement précoce après la fécondation. Les mécanismes moléculaires de répression de la transcription au cours de la gamétogenèse restent à élucider. Il en est de même pour la mise en place de l'empreinte parentale chez les espèces où le phénomène se produit.

La fécondation consiste d'abord dans l'interaction spécifique des membranes plasmiques du spermatozoïde et de l'ovocyte, puis dans la réalisation de diverses étapes membranaires, cytoplasmiques

et nucléaires conduisant à l'activation du génome zygotique et aux premières étapes "autonomes" du développement du nouvel individu diploïde. Par ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection), on a pu observer que les spermatozoïdes testiculaires et même des spermatides pouvaient conduire à des fécondations normales (apparemment, mais nous n'avons aucun recul sur le devenir des individus ainsi produits dans les diverses espèces animales, ce qui conduit à s'inquiéter sur l'empressement de certains à déjà faire de même chez l'homme). Plusieurs groupes au CNRS travaillent sur la maturation des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles (épididyme, canal déférent etc.) et femelles (capacitation). Ces événements ne semblent concerner que les propriétés de motilité et de reconnaissance de l'ovocyte du spermatozoïde. Leur étude est néanmoins importante, car ils constituent des points privilégiés pour la mise au point de méthodes contraceptives chez l'homme (vaccinations contre des protéines épididymaires de la surface du spermatozoïde ou de la surface ovocytaire). L'étude des migrations des pro-nucléi mâle et femelle au travers de leurs interactions avec le cytosquelette et celle de leurs interactions spatiales puis fonctionnelles (dépression des génomes gamétiques, contrôles croisés entre ces génomes, empreinte parentale, activation du génome zygotique) constituent des défis majeurs pour notre compréhension de la constitution d'un nouvel individu et de son développement précoce.

## À propos du développement précoce

La période embryonnaire suivant la fécondation va s'accomplir en l'absence de transcription des gènes zygotiques. Tout est contrôlé à partir des protéines existantes et des ARN maternels. C'est un programme de traduction de ces ARN, parfaitement régulé dans le temps et souvent dans l'espace, qui va se mettre en place et permettra la synthèse de facteurs essentiels pour le développement embryonnaire. Les éléments responsables de la localisation et de la traduction programmée restent à élucider. Ces points sont essentiels à comprendre dans la mesure où certains produits de ces ARN maternels sont des activateurs transcriptionnels de gènes spécifiques qui vont donc conditionner la suite du développement embryonnaire (exemple : mise en

place du mésoderme). D'une manière plus générale, la transcription zygotique va être activée au stade dit mi-blastula. Cette activation reste néanmoins différentielle (gène-spécifique) ; de ce point de vue, l'empreinte parentale peut être considérée comme un cas particulier de l'activation du génome zygotique. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces phénomènes sont encore largement inconnus.

Cette période du développement qui suit la fécondation est une période de prolifération cellulaire extrêmement intense. Le déroulement des cycles est contrôlé à partir des protéines existantes ou de la régulation de la traduction des ARN maternels. Les connections entre la machinerie de traduction et le bon déroulement de ces cycles sont à identifier. Les cycles cellulaires sont très particuliers (pas de phase G1, ni de G2), l'ADN est répliqué très rapidement du fait de la présence d'un très grand nombre de réplicons qui sont tous inhibés au même moment. Conjointement à la reprise de la transcription zygotique, les phases G1 et G2 vont apparaître, la durée de la phase S va augmenter, correspondant à la mise en place dans le temps d'un véritable programme d'initiation des réplicons. Les éléments qui contrôlent et président à ces changements restent à être identifiés. L'étude des régulateurs du cycle cellulaire en relation avec la différenciation cellulaire (cellules totipotentes) est essentielle pour la caractérisation des cellules souches embryonnaires (ES).

Les éléments et les signaux qui vont positionner le(s) fuseau(x) mitotique(s) au cours des divisions cellulaires et qui vont programmer les plans des divisions de l'œuf, puis des blastomères, sont très peu connus, mais sont évidemment tout à fait essentiels à connaître.

Le phénomène de l'apoptose apparaît très rapidement au cours du développement. Il est clair que le phénomène est général au sein des espèces, qu'il est déclenché à différents moments du développement, qu'il est essentiel (mutants *Drosophile* non viables) et que l'on n'en connaît qu'assez peu de chose. Comment le phénomène est-il initié ? Quel(s) est (sont) le(s) signal(aux) impliqué(s) ? Quel(s) en est (sont) les voies de transduction ? Quels sont les "meilleurs" modèles pour appréhender ces questions ? Certains étapes peuvent-elles être étudiées *in vitro* ?