



## Rôle de la duplication partielle du gène *SRGAP2* dans l'évolution et le développement du cerveau humain

Cécile Charrier, Franck Polleux

Scripps Research Institute, Department of Cell Biology, Dorris Neuroscience Center, 10550 North Torrey Pines Road, Mail Drop DNC 202, La Jolla, CA 92037-1000, États-Unis.  
polleux@scripps.edu

► Un événement majeur de l'évolution du cerveau des mammifères est l'expansion du néocortex et l'accroissement de sa complexité. Ces différences représentent le substrat anatomique des différences cognitives et culturelles entre les humains et les primates non-humains. Cependant, notre compréhension des mécanismes génétiques, qui ont permis l'émergence de ces différences durant l'évolution, et leurs conséquences sur la composition neuronale, les réseaux neuronaux ou le fonctionnement synaptique reste fragmentaire.

Il a été montré récemment qu'un pic de duplications de segments de chromosomes s'est produit dans la lignée humaine lors de la séparation de cette dernière d'avec les primates non-humains (chimpanzés, bonobos), il y a environ six millions d'années. Les duplications de séquences génomiques représentent un mécanisme d'innovation moléculaire majeur en permettant la création de nouveaux gènes au cours de l'évolution [1, 2]. Une trentaine de gènes ont été dupliqués uniquement chez l'homme [3, 4], dont *SRGAP2* (*Slit-Robo-GTPase activating protein 2*). Ce gène est exprimé dans le cerveau au cours du développement et a été initialement identifié par notre laboratoire comme un régulateur de la migration et de la différenciation des neurones pyramidaux dans le cortex [5]. Les premières analyses suggéraient l'existence de deux copies supplémentaires de ce gène dans le génome humain [4]. Nous avons donc postulé que ces duplications pouvaient avoir contribué à certains aspects de la spéciation du cerveau humain.

### ***SRGAP2* : un gène partiellement dupliqué dans le génome humain**

Les séquences récemment dupliquées présentent un très fort taux d'identité (> 99,5 %) avec les séquences d'origine et sont donc en général absentes ou mal assemblées dans le génome de référence. Pour déterminer la localisation et la structure des duplications de *SRGAP2*, le laboratoire d'É. Eichler à l'université de Washington (Seattle, États-Unis) a construit et séquencé une banque de chromosomes artificiels bactériens issus d'ADN génomique d'une môle hydatiforme complète<sup>1</sup> [6]. Cette dernière résulte de la fécondation d'un ovocyte humain énucléé par un spermatozoïde unique ; elle contient donc un équivalent haploïde du génome humain qui a l'avantage de ne pas présenter de variation allélique. Les auteurs ont ainsi mis en évidence trois copies supplémentaires de *SRGAP2* dans le génome humain. La comparaison des séquences a permis de retracer l'évolution des duplications (Figure 1A). Le gène ancestral *SRGAP2A* a subi une première duplication partielle générant *SRGAP2B*, il y a environ 3,4 millions d'années. Cette duplication d'environ 260 000 paires de bases (260 kpb) comprend les neuf premiers exons du gène ancestral *SRGAP2A* (22 exons au total) ainsi que les séquences

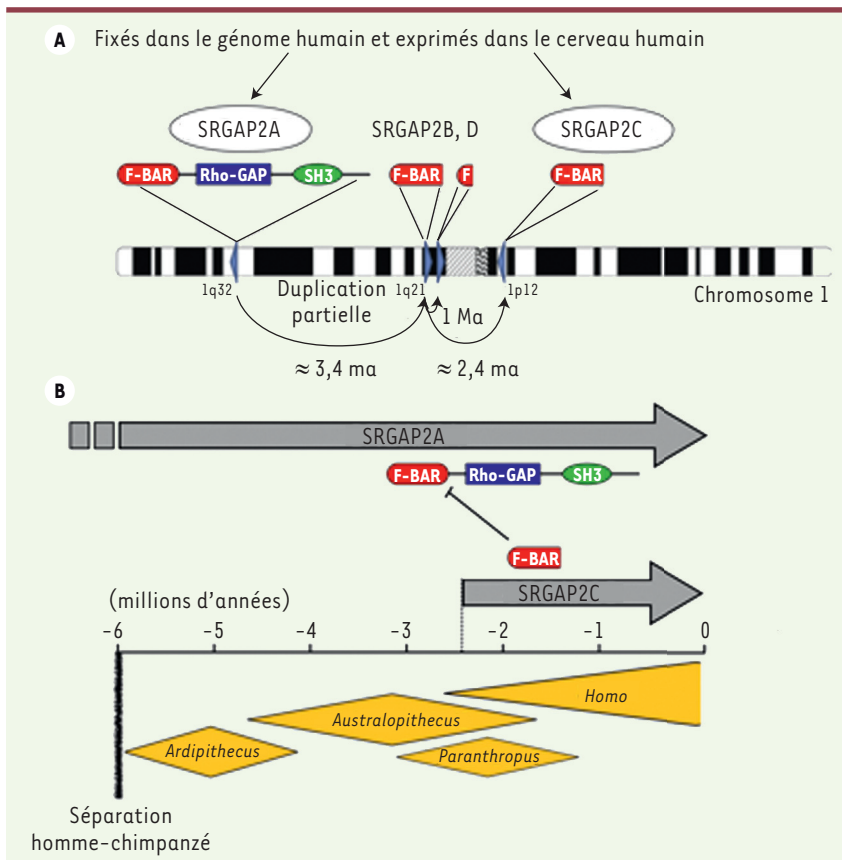
<sup>1</sup> Une môle hydatiforme se développe lors d'une grossesse résultant d'une anomalie de la fécondation et caractérisée par une prolifération trophoblastique sans développement embryonnaire normal possible (0,1 à 0,5 % des grossesses). La môle complète dérive de la fécondation d'un ovule anucléé par un ou deux spermatozoïdes haploïdes. C'est une grossesse sans embryon où seules les membranes placentaires se développent. Les môles hydatiformes partielles sont triploïdes, issues de la fécondation d'un ovocyte contenant un pronucléus femelle par deux spermatozoïdes, ou par un spermatozoïde anormal.

régulatrices. La duplication de *SRGAP2B*, il y a environ 2,4 millions d'années, a ensuite généré *SRGAP2C*. Cette seconde duplication (> 500 kpb) contient les séquences de la première duplication dans leur totalité ainsi que d'autres régions adjacentes. *SRGAP2B* a été dupliqué à nouveau il y a environ 1 million d'années. Cependant, le produit de cette dernière duplication (*SRGAP2D*) contient des délétions supplémentaires, et il est peu probable qu'il soit exprimé. Le séquençage complet du génome de plus de 600 individus sains (1 000 *Genomes Project*) a révélé que seuls *SRGAP2A* et *SRGAP2C* présentent un nombre fixe de copies dans le génome humain, alors que le nombre de copies de *SRGAP2B* varie [6]. Ceci suggère que *SRGAP2B* est en train de devenir un pseudogène alors que *SRGAP2C* est potentiellement un nouveau gène spécifiquement humain.

### **Inhibition de *SRGAP2* ancestral par ses copies humaines : conséquences sur le développement du cortex**

#### **Protéines codées par les copies du gène *SRGAP2* ancestral**

*SRGAP2A* code pour une protéine fortement conservée chez les mammifères (*SRGAP2*). *SRGAP2* comprend trois domaines fonctionnels : un domaine F-BAR (*Bin*, *amphiphysin*, *Rvs*) en amino-terminal, capable d'induire des filopodes lorsqu'il est exprimé dans des lignées cellulaires [5] ; suit un domaine central de type Rho-GAP (*GTPase-activating protein*) qui catalyse l'activité GTPase de Rac1 ; et enfin une queue carboxy-terminale contenant un domaine SH3 (*src homology 3 domain*). *SRGAP2B* et *SRGAP2C*, qui



**Figure 1. Évolution du gène SRGAP2 dans la lignée humaine.** **A.** Représentation de la localisation et de l'évolution des paralogues du gène SRGAP2 (triangles bleus) sur le chromosome 1 humain. Le déroulement temporel des duplications est indiqué sous le chromosome. Les protéines prédites à partir des séquences dupliquées sont indiquées au-dessus du chromosome. Tous les paralogues spécifiquement humains codent potentiellement pour des formes tronquées de SRGAP2. Seuls SRGAP2A et SRGAP2C (entourés) sont fixés dans le génome humain et exprimés dans le cerveau humain (ma : millions d'années) (modifié d'après [6]). **B.** Schéma représentant l'expression de SRGAP2A et SRGAP2C (gris) au cours de l'évolution de la lignée humaine depuis la séparation d'avec les primates non-humains. Différents genres d'hominidés sont représentés en jaune le long de la ligne du temps. SRGAP2A est présent chez tous les mammifères, alors que l'apparition de SRGAP2C coïncide avec la séparation entre le genre *Homo* et les australopithèques [6]. SRGAP2C inhibe la fonction de SRGAP2A en interagissant avec son domaine F-BAR [7].

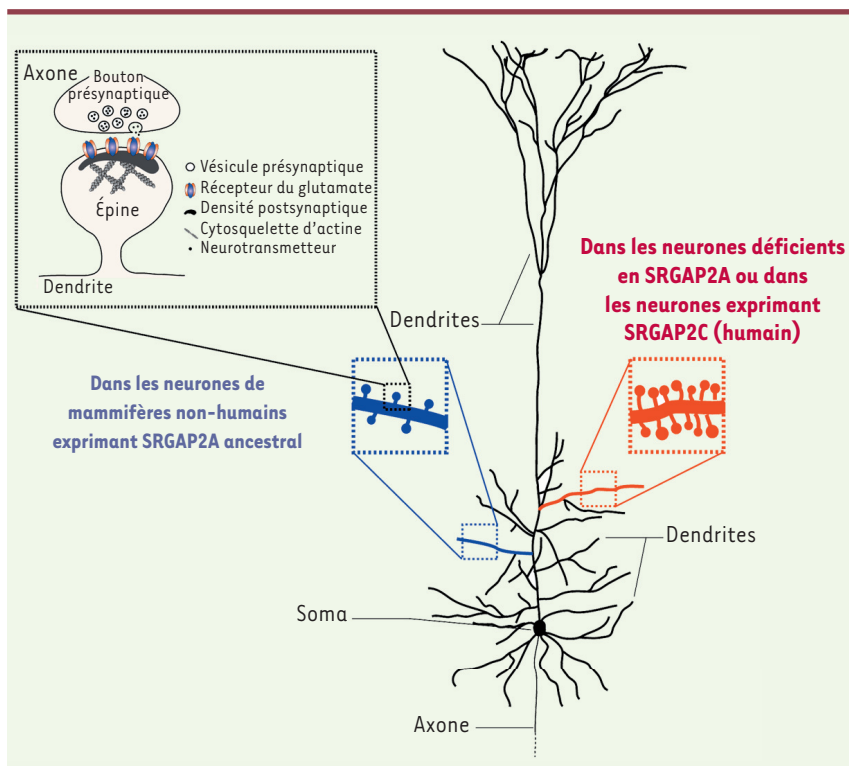
ont une séquence très similaire, codent pour une protéine correspondant au domaine F-BAR de SRGAP2, tronqué de ses 49 derniers acides aminés (Figure 1A). SRGAP2A et SRGAP2C sont transcrits dans le cerveau humain embryonnaire et adulte, ainsi que dans des neurones de type « télencéphaliques » dérivés *in vitro* de cellules souches embryonnaires humaines [7]. Dans le cerveau humain, leur patron d'expression est similaire dans les progéniteurs neuronaux et les neurones postmitotiques. Une protéine correspondant à SRGAP2B/C est également détectée dans des lignées issues de neuroblastomes humains. Les protéines SRGAP2B et SRGAP2C ont perdu la capacité de déformation de membrane qu'exprime SRGAP2A, mais conservent la capacité de dimérisation conférée par leur domaine F-BAR [7]. L'interaction entre SRGAP2A et la forme humaine tronquée SRGAP2C inhibe la fonction de SRGAP2A (Figure 1B). Ainsi, *in vivo*, au cours du développement embryonnaire, SRGAP2A promeut le branchement des neurones pyramidaux,

ce qui ralentit leur migration dans le cortex. En revanche, l'introduction de SRGAP2C dans des neurones de souris par électroporation *in utero* phénotype la perte de fonction de SRGAP2 et accélère la migration des neurones dans le cortex [7]. Cet effet ne perturbe pas le placement final des neurones dans le cortex, mais pourrait représenter un avantage dans le cerveau humain où la distance à parcourir est beaucoup plus longue.

### Antagonisme entre SRGAP2A et SRGAP2C dans le contrôle de la formation des épines dendritiques

Puisque la perte de fonction de SRGAP2 ne modifie pas l'organisation laminaire du cortex, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine à des stades plus tardifs du développement. Chez la souris, SRGAP2 est abondamment exprimée dans le cortex pendant les premières semaines après la naissance, une période pendant laquelle se forment la majorité des connexions synaptiques. Nous avons montré que SRGAP2 s'accu-

mule dans les épines dendritiques, des protrusions localisées le long des dendrites qui reçoivent la majorité des afférences excitatrices dans le cortex où la protéine est associée à la densité postsynaptique (Figure 2). Nous avons testé la fonction de SRGAP2 dans les épines en utilisant différentes approches de perte et de gain de fonctions. Nos résultats montrent que SRGAP2 régule trois caractéristiques des épines dendritiques : (1) la taille de la tête des épines ; celle-ci est corrélée à la taille de la densité postsynaptique, au nombre de récepteurs du glutamate de type AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) et elle peut être utilisée comme un indicateur de la maturation synaptique. (2) La longueur du cou des épines, qui influence l'isolation biochimique et électrique entre le contact synaptique localisé dans la tête et le tronc dendritique. (3) La densité des épines dendritiques. Ainsi, *in vivo*, la forme ancestrale de SRGAP2



**Figure 2. SRGAP2A et son paralogue humain SRGAP2C contrôlent la morphologie et la densité des épines dendritiques.** Les épines dendritiques (encart noir) couvrent les dendrites des neurones pyramidaux du néocortex. Elles représentent le compartiment postsynaptique des synapses excitatrices et sont généralement apposées à un bouton présynaptique qui libère des vésicules contenant du glutamate, le neurotransmetteur excitateur principal dans le système nerveux central. Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont accumulés dans les épines en face des terminaisons axonales où ils sont stabilisés de manière dynamique par les protéines de la densité postsynaptique, ce qui assure l'efficacité de la neurotransmission. Le cytosquelette d'actine est un déterminant majeur de la plasticité morphologique des épines. Chez tous les mammifères non-humains (encart bleu), SRGAP2A limite la densité d'épines dendritiques et promeut leur maturation au cours du développement (non montré). SRGAP2C, qui est exprimée uniquement dans les neurones humains, inhibe la fonction de SRGAP2A. L'expression de SRGAP2C dans les neurones de souris retarde la maturation des épines et conduit à l'augmentation de leur densité ainsi qu'à leur allongement (encart rouge). Ces effets miment la déficience génétique en SRGAP2A dans les neurones de souris et sont caractéristiques du développement des neurones corticaux pyramidaux humains (voir [7]).

promeut la maturation des épines et limite leur densité, alors que l'expression de SRGAP2C dans des neurones corticaux de souris retarde leur maturation (néoténie) et conduit à une forte augmentation de la densité des épines. Celles-ci maintiennent, au stade adulte, des cous allongés par rapport aux épines contrôles (Figure 2) [7].

Il est remarquable que l'expression de SRGAP2C mime, au stade embryonnaire comme aux stades juvénile et adulte, les

effets consécutifs à la réduction de l'expression de la protéine SRGAP2 endogène, de même que ceux qui sont observés dans une souris mutante hypomorphe. Ceci indique que SRGAP2C est capable d'inhiber la fonction de la forme ancestrale SRGAP2A dans les neurones corticaux tout au long du développement, avec pour conséquences des épines plus grandes et présentes à une plus forte densité. Plusieurs groupes ont montré que les neurones corticaux pyramidaux humains

se caractérisent par une prolongation de la période de développement des épines (néoténie) [8, 9] et une plus grande complexité morphologique (incluant une densité d'épines plus élevée et des épines aux cous plus longs) par rapport aux neurones de singes ou de souris [10, 11]. Nos résultats suggèrent que les duplications spécifiquement humaines de SRGAP2, survenues au moment de la séparation entre le genre *Homo* et les australopithèques, ont contribué à l'émergence de ces caractéristiques.

### Conclusion

Chez l'homme, l'augmentation de la densité d'épines indique que les neurones sont engagés dans un nombre plus important de contacts synaptiques, alors que l'allongement du cou des épines suggère des différences dans les propriétés d'intégration synaptique. La complexification des neurones corticaux pyramidaux, associée au prolongement de la période particulièrement plastique de développement synaptique, pourrait augmenter les possibilités de stockage et la flexibilité du traitement de l'information dans les réseaux corticaux. Elle pourrait ainsi contribuer à la richesse des interactions entre l'homme et son environnement, ainsi qu'à ses capacités cognitives, d'apprentissage et de mémorisation. Dans ce contexte, l'identification des mécanismes moléculaires par lesquels SRGAP2 régule le développement des épines et qui sont modifiés spécifiquement chez l'homme du fait de l'expression de SRGAP2C, pourrait ouvrir de nouvelles voies pour la compréhension des troubles neuro-développementaux ou psychiatriques, comme l'autisme ou la schizophrénie.

### How human-specific SRGAP2 gene duplications control human brain development

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Lynch M, Katju V. The altered evolutionary trajectories of gene duplicates. *Trends Genet* 2004 ; 20 : 544-9.
2. Ohno S. *Evolution of gene duplication*. Berlin : Springer-Verlag, 1970.
3. Marques-Bonet T, Kidd JM, Ventura M, et al. A burst of segmental duplications in the genome of the African great ape ancestor. *Nature* 2009 ; 457 : 877-81.
4. Sudmant PH, Kitzman JO, Antonacci F, et al. Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* 2010 ; 330 : 641-6.
5. Guerrier S, Coutinho-Budd J, Sassa T, et al. The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis. *Cell* 2009 ; 138 : 990-1004.
6. Dennis MY, Nuttle X, Sudmant PH, et al. Evolution of human-specific neural SRGAP2 genes by incomplete segmental duplication. *Cell* 2012 ; 149 : 912-22.
7. Charrier C, Joshi K, Coutinho-Budd J, et al. Inhibition of SRGAP2 function by its human-specific paralogs induces neoteny during spine maturation. *Cell* 2012 ; 149 : 923-35.
8. Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 1997 ; 387 : 167-78.
9. Petanjek Z, Judas M, Simic G, et al. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 13281-6.
10. Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yanez I, DeFelipe J, Yuste R. Cortical area and species differences in dendritic spine morphology. *J Neurocytol* 2002 ; 31 : 337-46.
11. Elston GN, Benavides-Piccione R, DeFelipe J. The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey. *J Neurosci* 2001 ; 21 : RC163.

## NOUVELLE

### Expulser les cellules suspectes

#### La politique épithéliale

Laure Coulombel

médecine/sciences,  
ADR Inserm Paris V,  
2, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.  
[laure.coulombel@inserm.fr](mailto:laure.coulombel@inserm.fr)

> Les premières étapes de la transformation tumorale sont les plus mal connues parce que leur modélisation est limitée par la difficile reconstitution *in vitro* de la complexité de l'architecture tissulaire *in vivo*, et par la difficulté de saisir expérimentalement à l'échelon clonal les tout premiers événements de la transformation. Plusieurs articles récents abordent cette question en révélant comment un épithélium expulse une cellule au comportement suspect, qui risquerait donc de rompre l'équilibre du tissu. Mais ce processus d'expulsion peut aussi être une réponse physiologique : chez l'embryon, la délamination est un processus normal de morphogenèse des cellules neurales ou encore des cellules souches hématopoïétiques à partir de l'endothélium comme l'ont décrit C. Robin [1] et P. Herbomel [2] dans ces colonnes ; il peut aussi s'agir de l'expulsion de cellules apoptotiques ou en surnombre dans un épithélium en renouvellement. À moins, malheureusement, que ce ne soit une stratégie habile des cellules tumorales pour se libérer d'un environnement contraint et inhibiteur et proliférer sans retenue. Nous illustrons ci-dessous quelques-uns des exemples récemment décrits dans la littérature de l'expulsion par un épithélium adulte de cellules vivantes [3, 7].

#### Un épithélium très vigilant

L'expulsion d'une cellule hors d'un épithélium, par la voie apicale ou basale, a été bien étudiée chez la drosophile. Dans une *Nouvelle* publiée en 2010 dans *médecine/sciences*, S. Dupré-Crochet et al. [3] décrivait un exemple de ce processus d'exclusion chez les mammifères. Ainsi, l'induction, dans une couche confluyente de cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) normales, de l'expression de Ras<sup>v12</sup> – une forme mutée de Ras –, ou celle de v-Src dans des cellules isolées, entraîne l'expulsion rapide de ces cellules à la surface apicale de la monocouche [3, 4]. L'expulsion ne se produit que si la cellule transformée reste entourée de cellules normales. Quel est le signal d'alerte, et qui le lance ? « Comment les cellules transformées et les cellules normales peuvent-elles reconnaître leurs différences ? » [3, 4]. Malgré la caractérisation de quelques uns des acteurs moléculaires, cette extrusion reste mal expliquée. Les auteurs soulignaient la nécessité de modèles plus physiologiques chez l'homme pour explorer l'hypothèse d'un mécanisme très précoce de protection contre la progression de la carcinogenèse et l'émergence de métastases.

C.T. Leung et J.S. Brugge ont exaucé ce vœu et viennent de publier dans *Nature* [5] l'analyse détaillée de ce processus d'extrusion dans un modèle 3D qui mime l'organisation en structures acinaires polarisées typiques de la glande mammaire (*Figure 1A*). Les cellules de la lignée humaine épithéliale mammaire MCF10A cultivées sur Matrigel (un équivalent de la membrane basale) forment des structures acinaires quiescentes, polarisées et organisées autour d'une lumière centrale (*Figure 2*). L'infection de ces structures cellulaires par de très faibles doses d'un lentivirus porteur d'une construction bicistronique inducible (Tet), induisant la coexpression d'un oncogène et d'une étiquette fluorescente GFP (*green fluorescent protein*), permet de cibler une cellule sur 10 acinus, ce qui mime la survenue d'un événement tumoral clonal. L'étiquette fluorescente permet de suivre le comportement de cette cellule transformée. L'expression de ERBB2 (HER2) dans ce modèle – un récepteur à activité tyrosine kinase membre de la famille des récepteurs de l'EGF (*epidermal growth factor*) et dont le gène est amplifié dans 30 % des cancers du sein – induit systématiquement la prolifération clonale