

Suivi de la destinée des cellules par injection de dextrane et de composés fluorescents



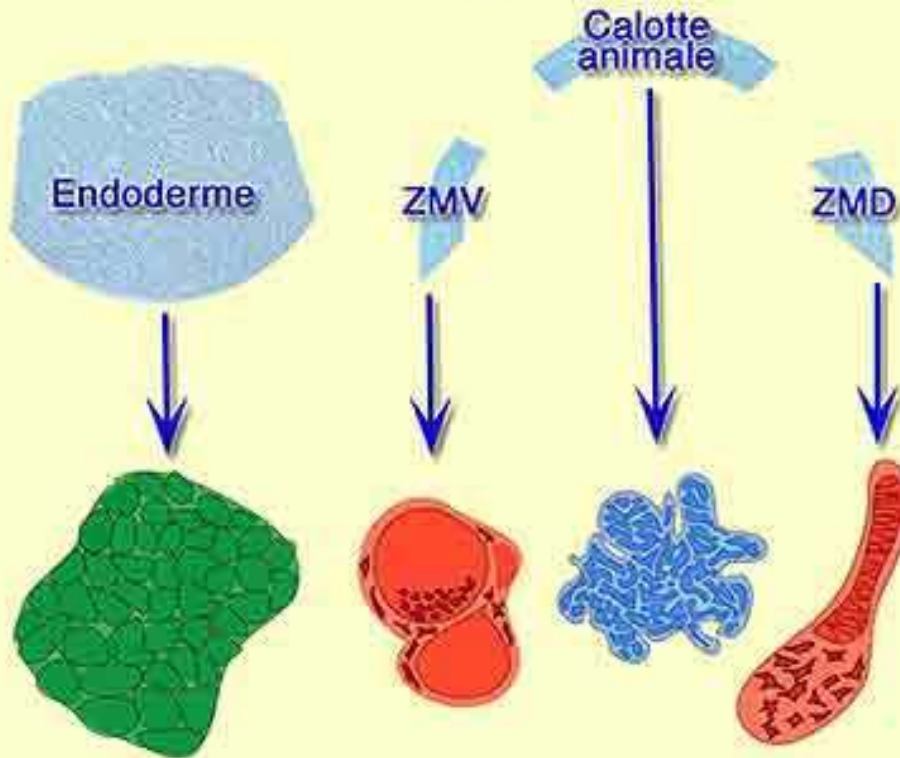
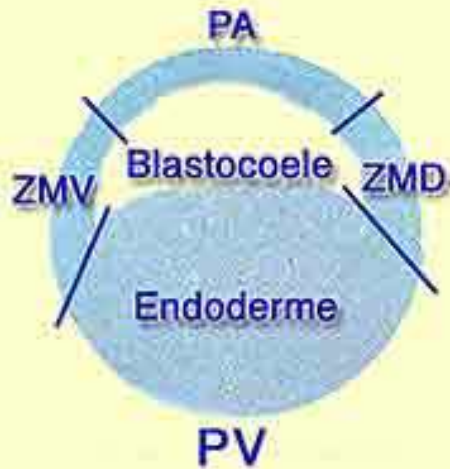
Les techniques modernes utilisent des composés fluorescents pour marquer les cellules de l'embryon.

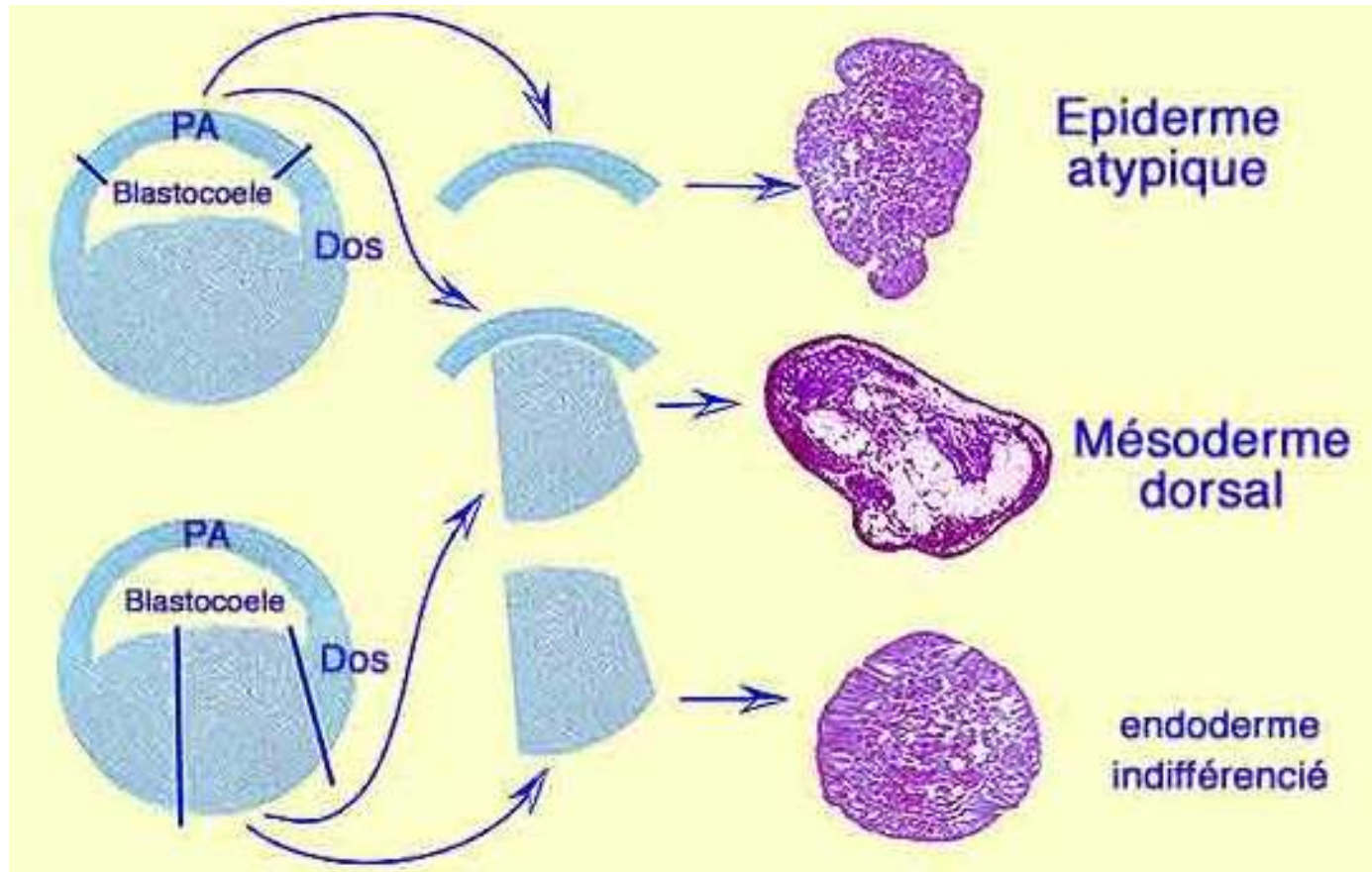
Document 1. Expériences de Nieuwkoop : mise en culture d'explants de blastula isolément.

Au stade blastula, des explants sont prélevés dans les 3 régions : calotte ectodermique, zone marginale et endoderme.

Après 3 jours de culture isolée, les résultats sont les suivants :

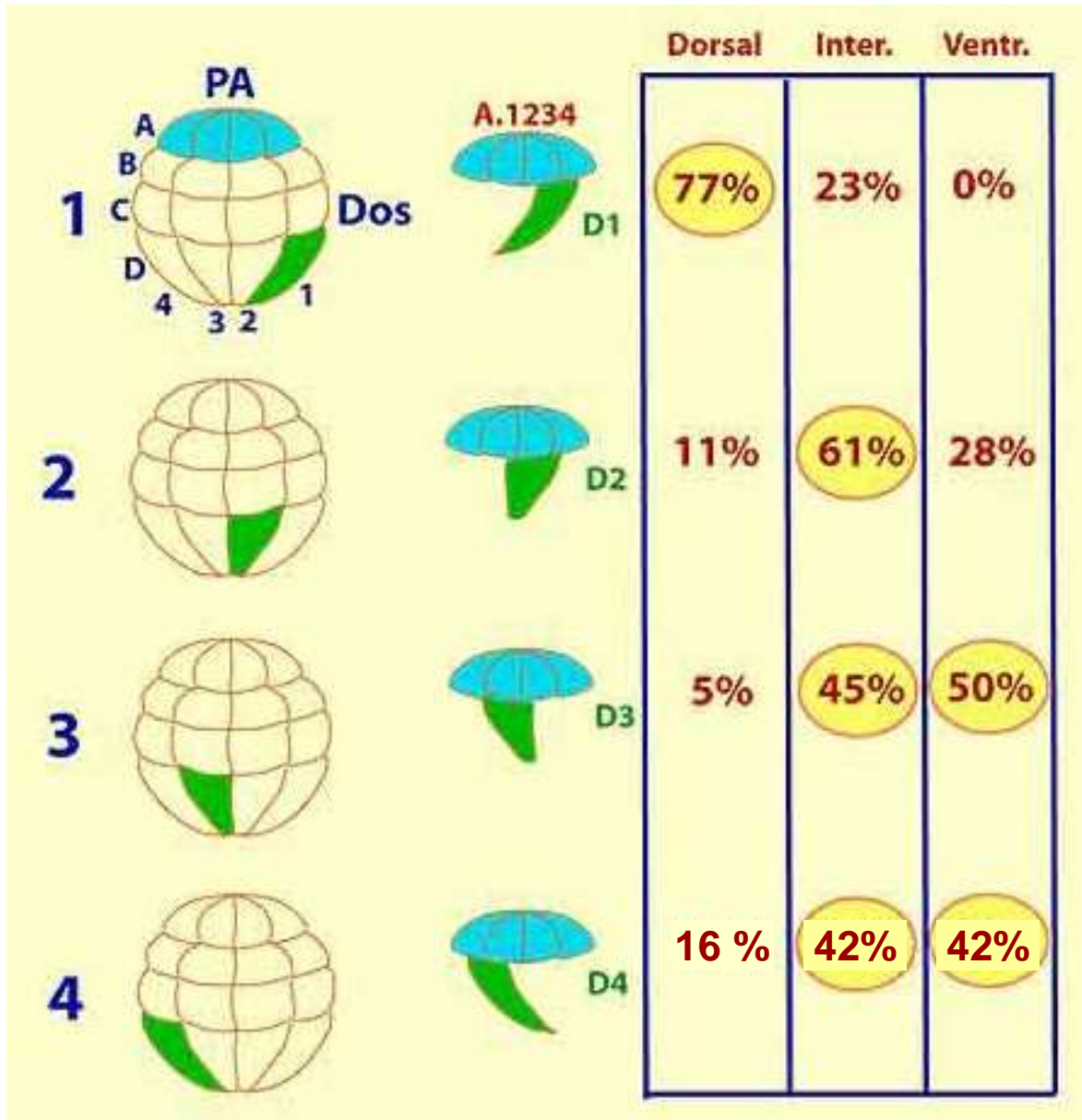
- calotte ectodermique --> épiderme atypique
- zone marginale dorsale --> mésoderme de type dorsal (chorde, somites)
- zone marginale ventrale --> mésoderme de type ventral (vésicules rappelant le coelome entouré par les lames latérales, cellules sanguines)
- cellules endodermiques --> endoderme indifférencié





Document 1 (suite). Expériences de Nieuwkoop : mise en culture d'explants de blastula recombinaés.

Les recombinaisons entre la calotte ectodermique et des explants endodermiques au stade blastula produisent du mésoderme.

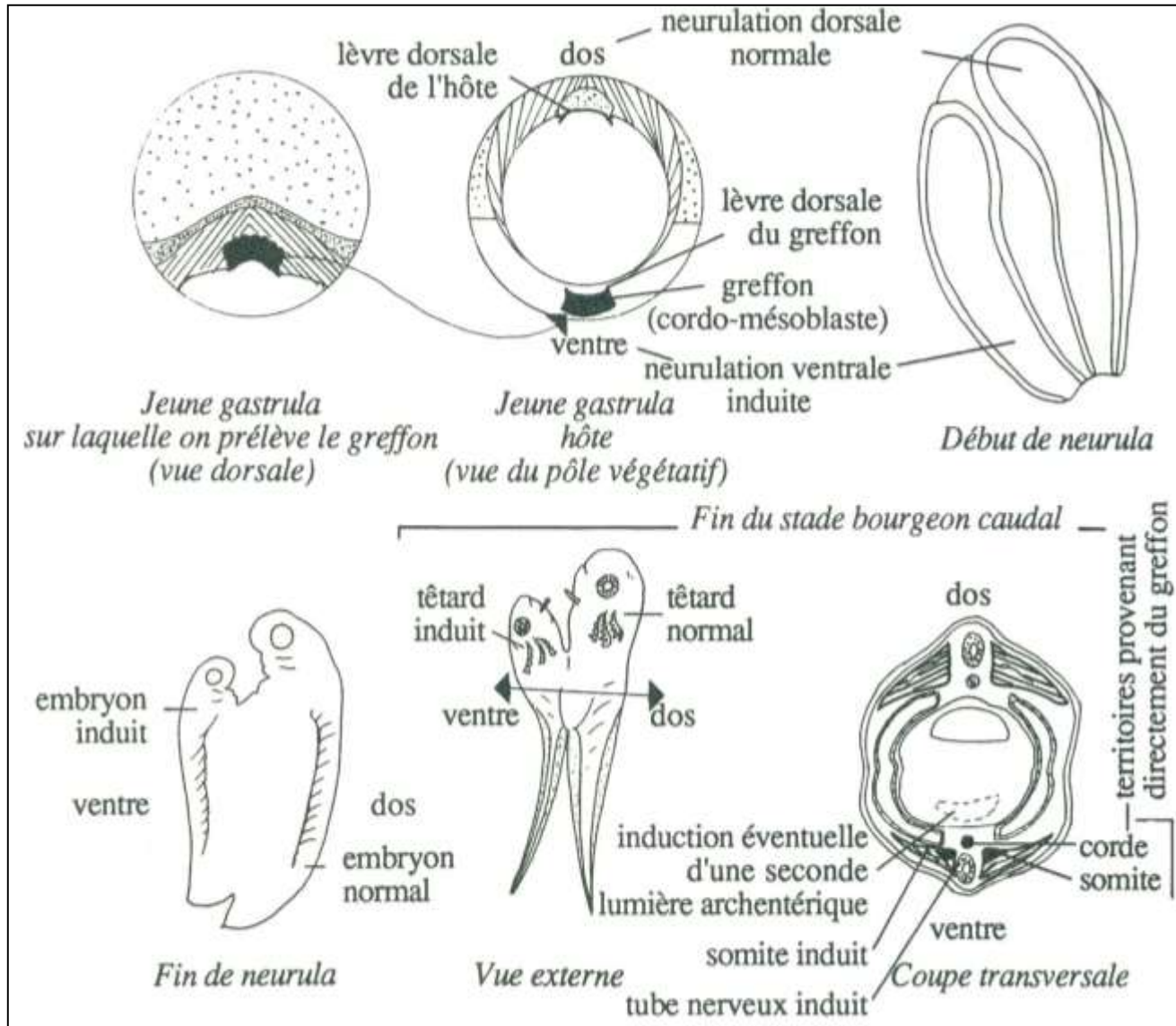
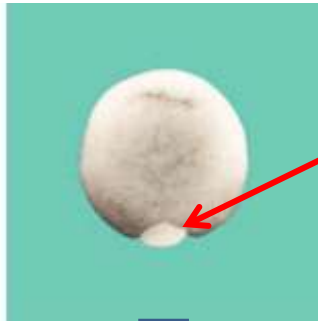


Document 2.
Expériences de Dale et Slack, (1987) :
mise en évidence
d'une régionalisation
de l'action
inductrices des
blastomères in vitro.

Recombinaisons effectuées entre les blastomères animaux de la rangée A avec un blastomère végétatif.

→ Une régionalisation de l'induction mésodermique est mise en évidence.

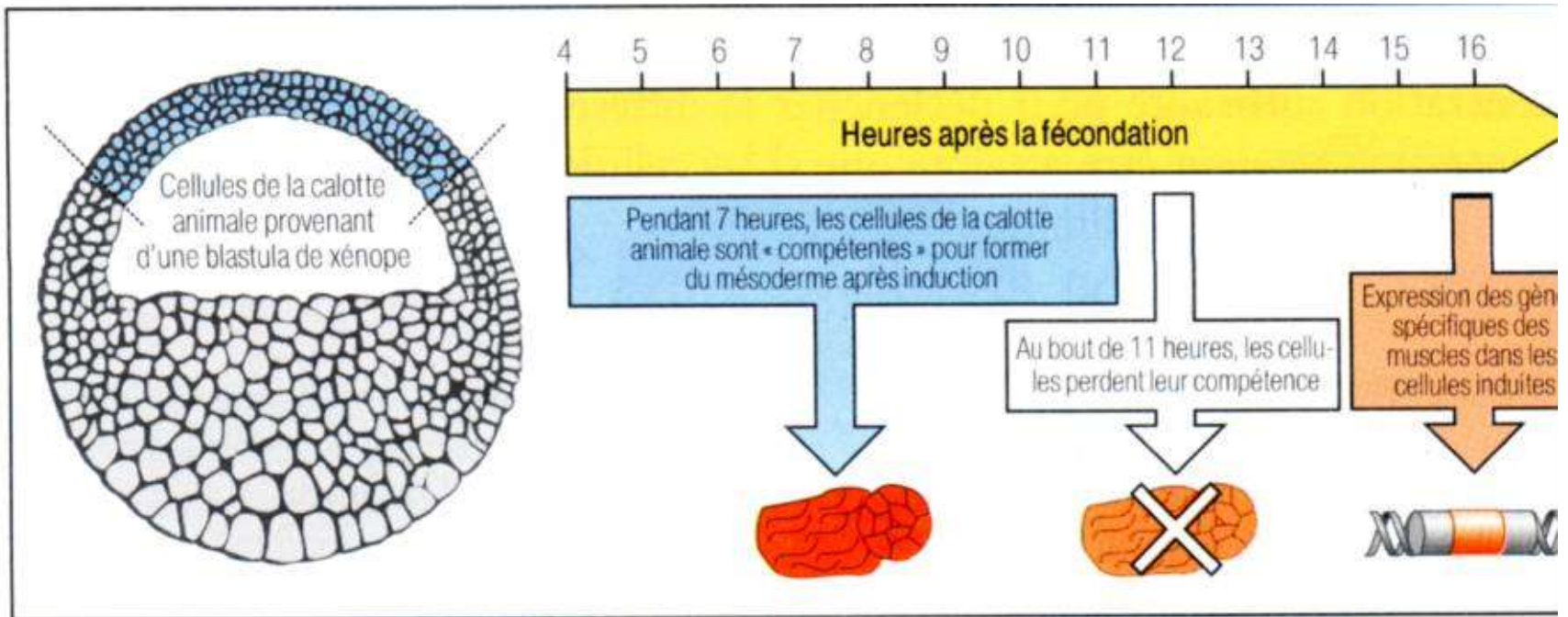
Document 3. Expérience de Spemann et Mangold : un autre exemple d'induction.

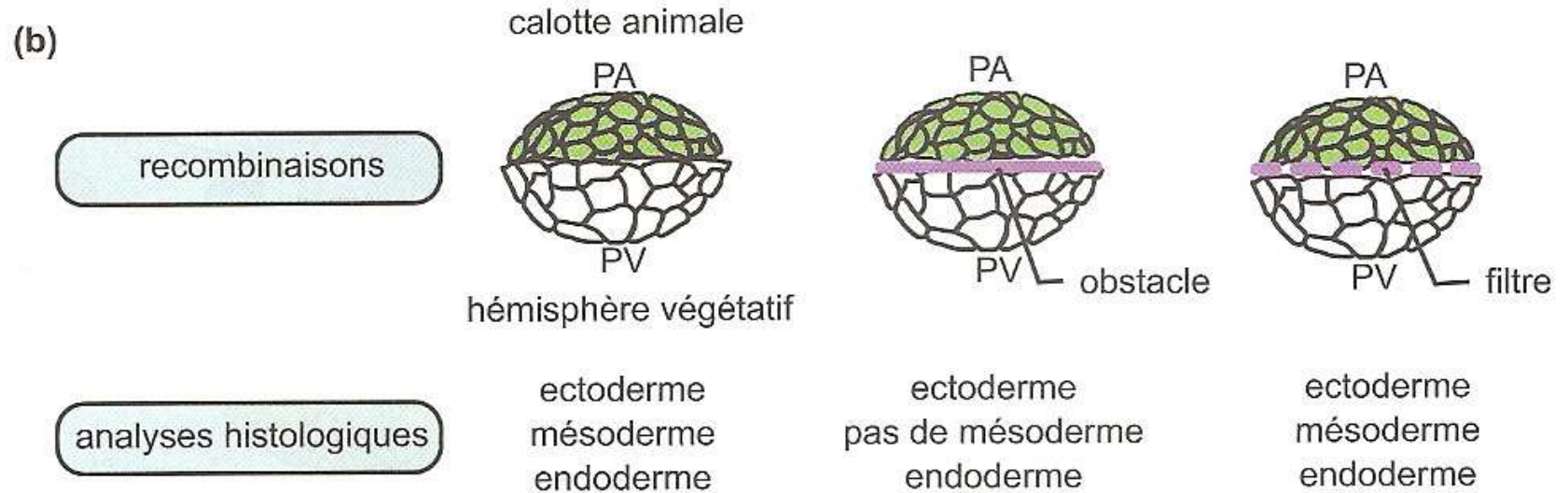
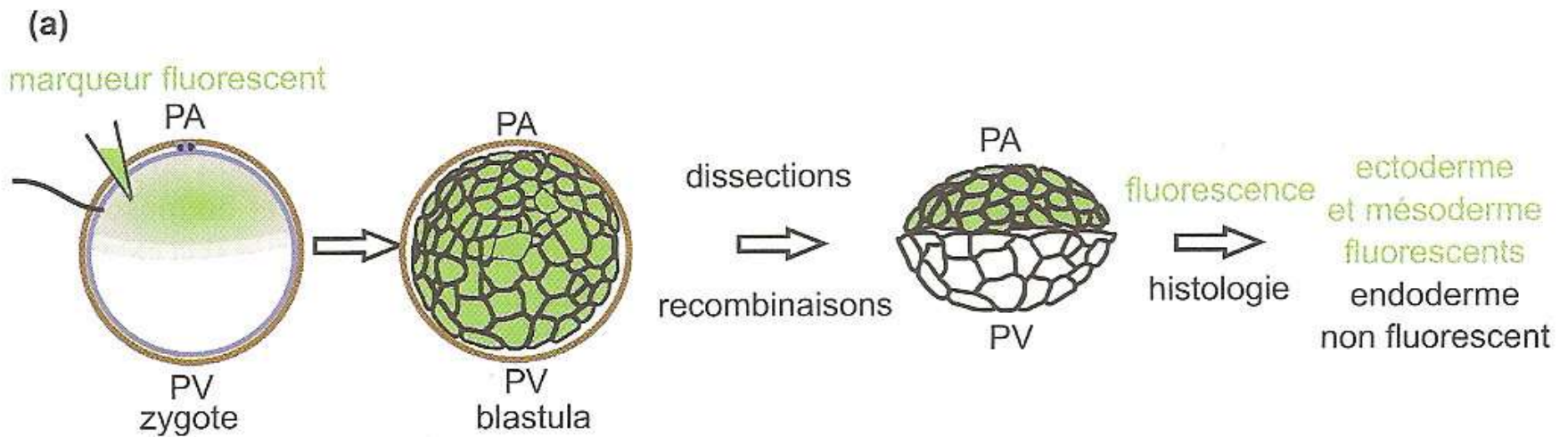


Document 4. Etude de la compétence des cellules lors de l'induction.

Cellules mises en culture	Tissus observés
Calotte animale de blastula + blastomères végétatifs de blastula	Épiderme Cellules de la corde Cellules musculaires Cellules sanguines Épithélium endodermique
Calotte animale de gastrula + blastomères végétatifs de blastula	Épiderme Épithélium endodermique
Calotte animale de blastula à mi-segmentation	Épiderme
Blastomères végétatifs de blastula à mi-segmentation	Épithélium endodermique
Calotte animale de gastrula à mi-gastrulation	Épiderme

Document 5. La compétence des cellules, une fenêtre temporelle.

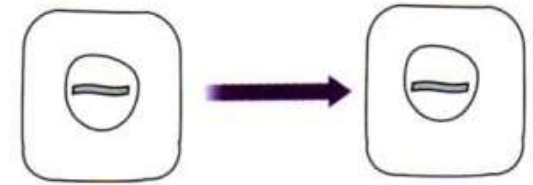




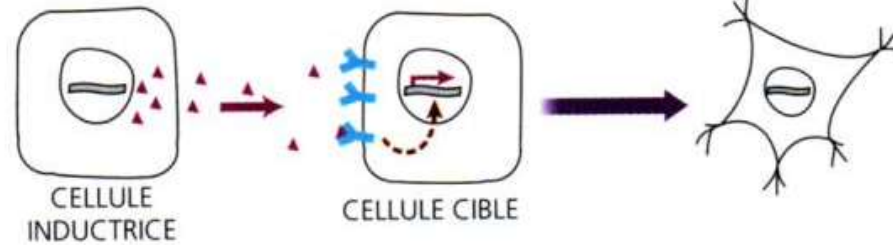
Document 6. Mise en évidence de l'intervention de substances inductrices.

Document 7. Conditions et régulation de la compétence des cellules.

a. en absence d'induction



b. induction

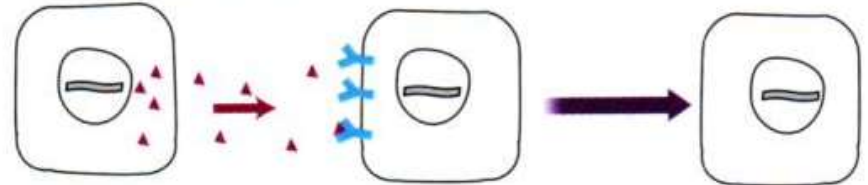


c. régulation de la compétence

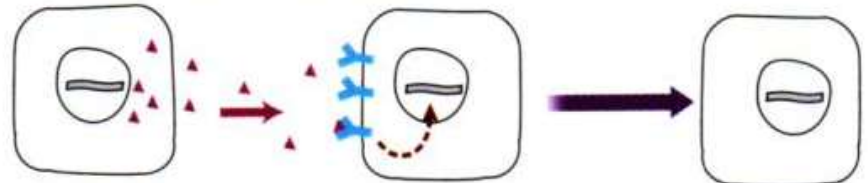
- pas de récepteur

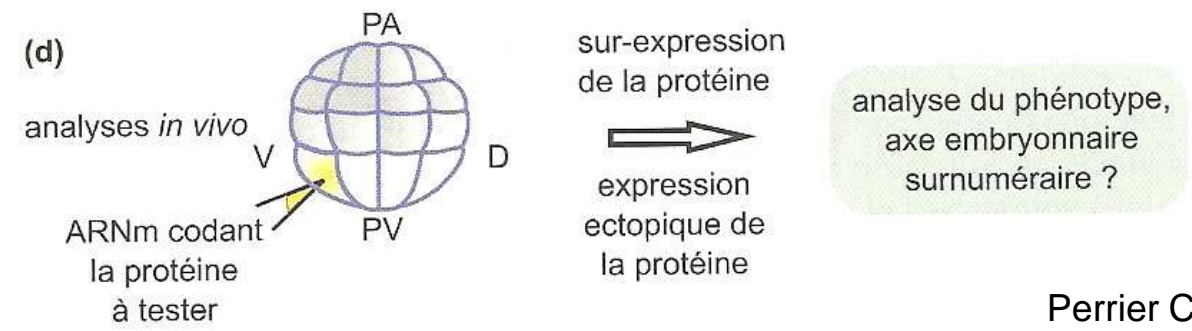
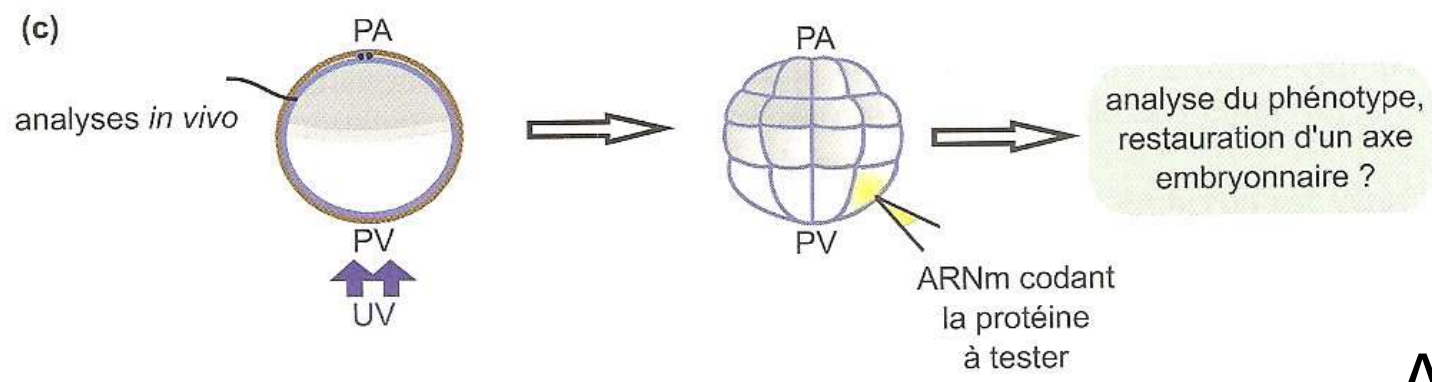
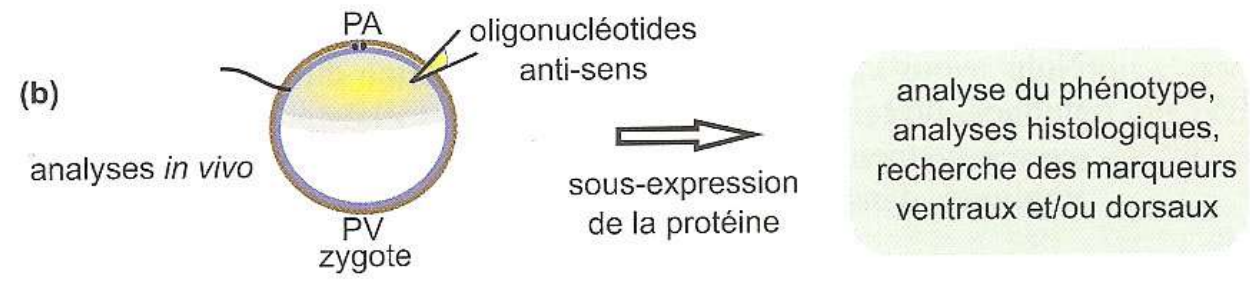
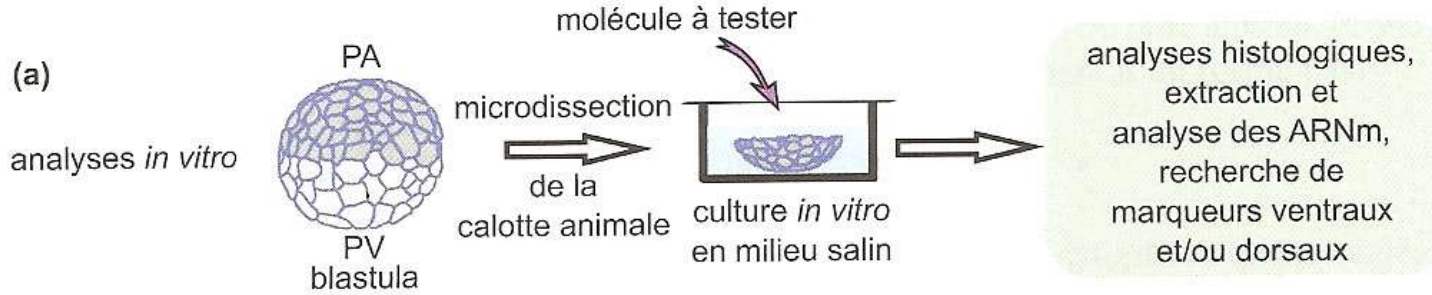


- pas de transduction du signal



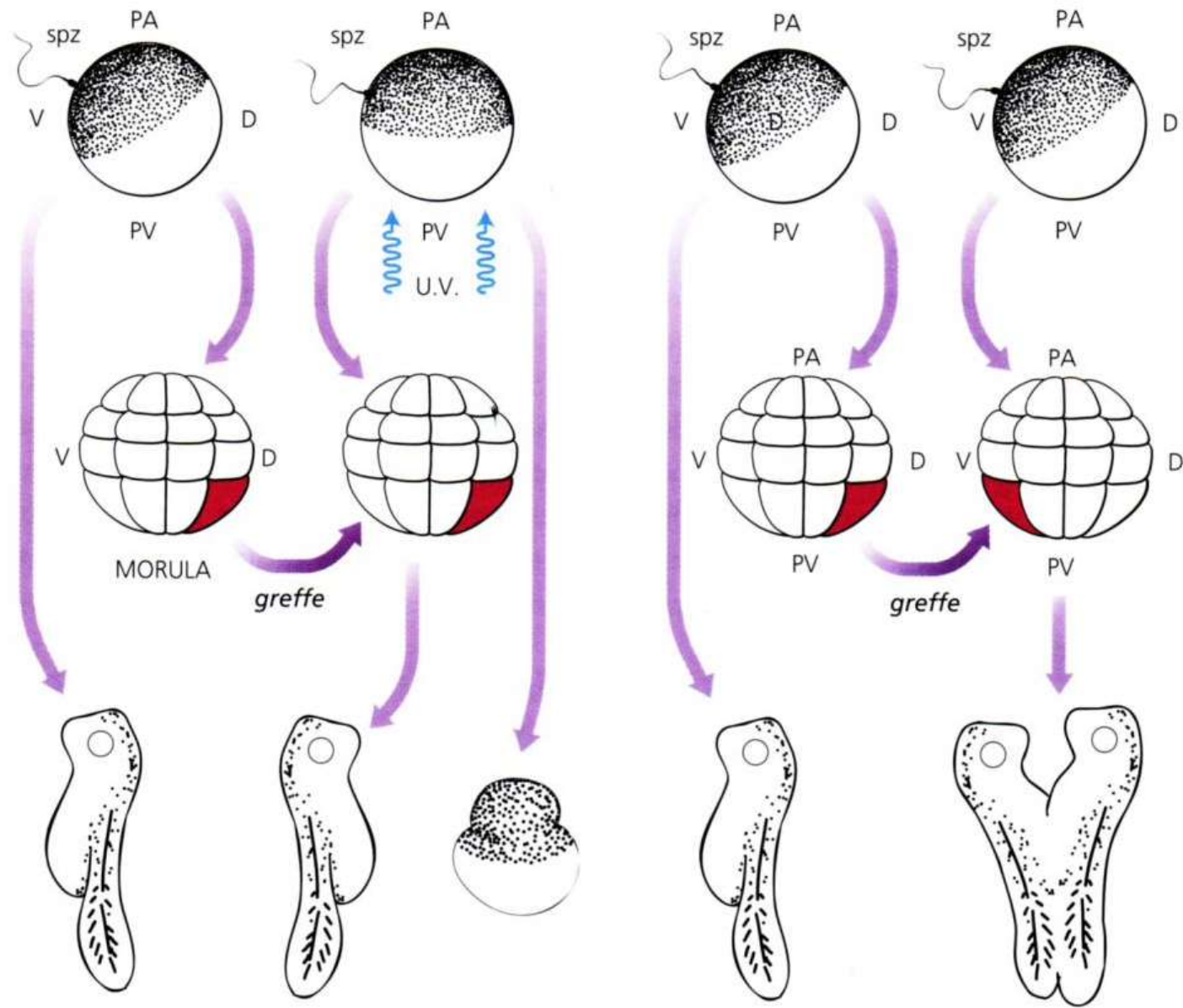
- pas d'activation de la transcription





Document 8. A la recherche des inducteurs du mésoderme.

Document 9.
Mise en évidence du centre inducteur de Nieuwkoop
 (Expériences de Gimlich et Gerhart, 1984-1986).



Témoin

Restauration de l'axe dorso-ventral

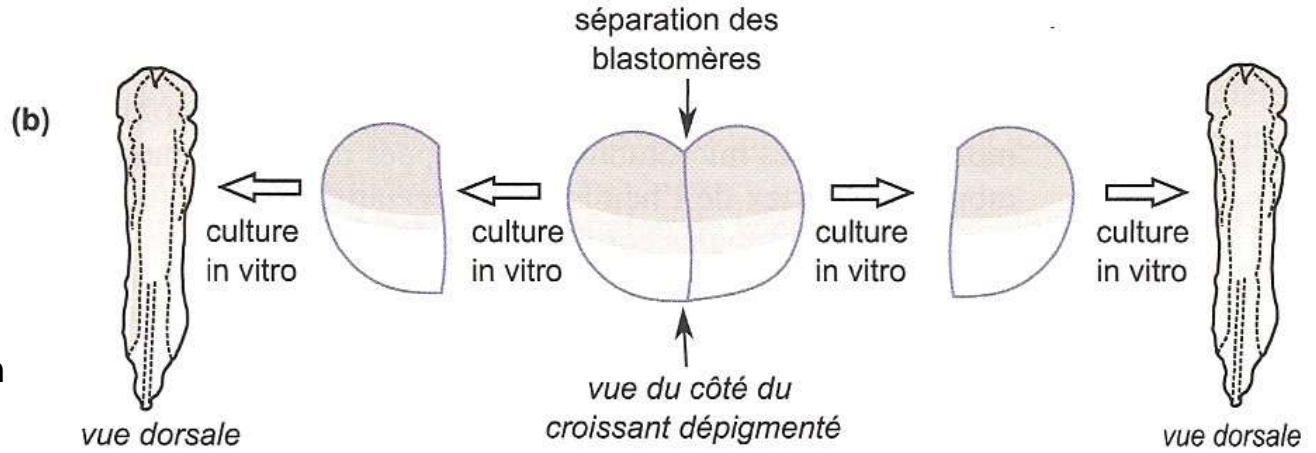
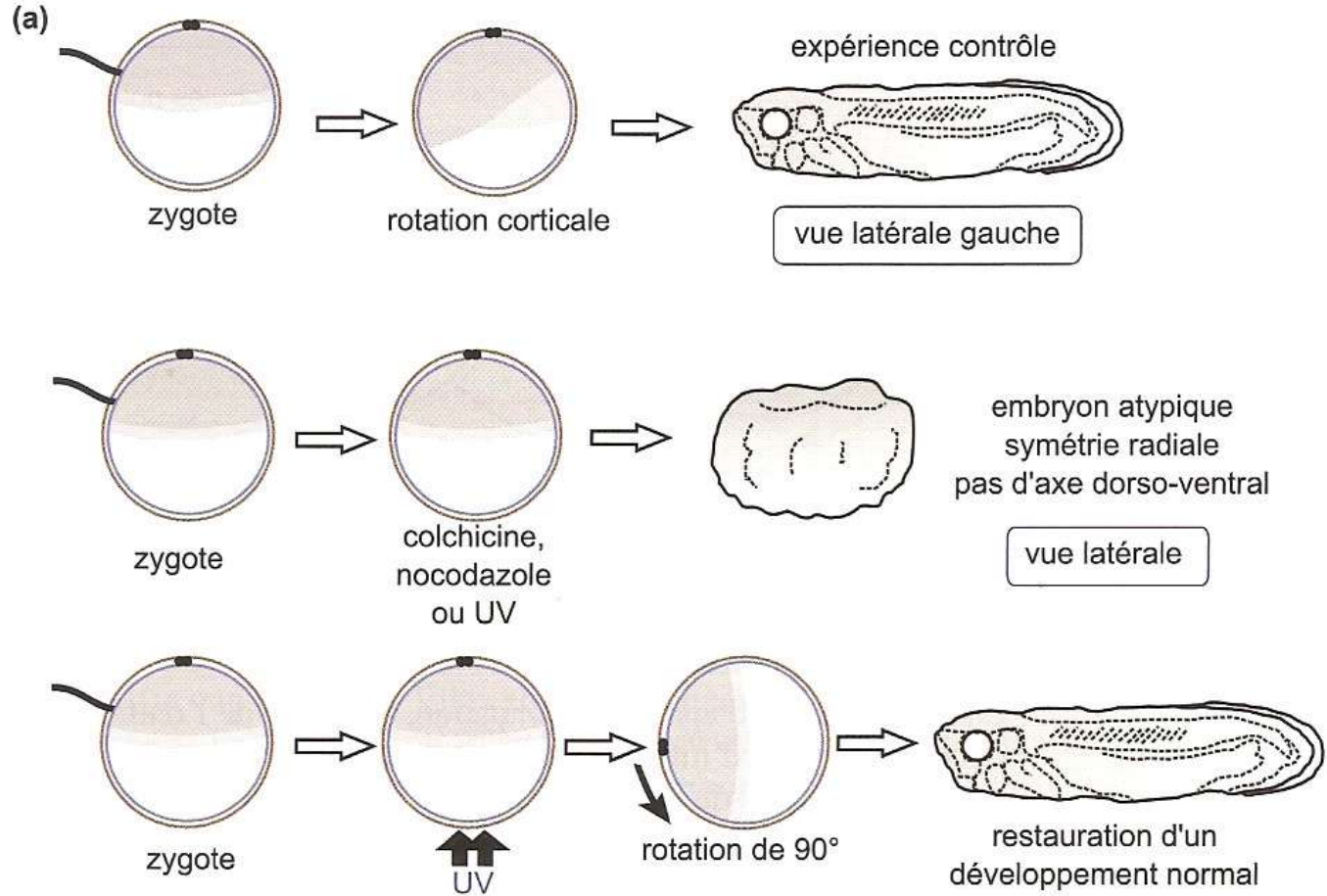
Embryon atypique ventralisé.
 Pas d'axe dorso-ventral
 Symétrie radiale.

Témoin

Formation d'un axe embryonnaire surnuméraire.

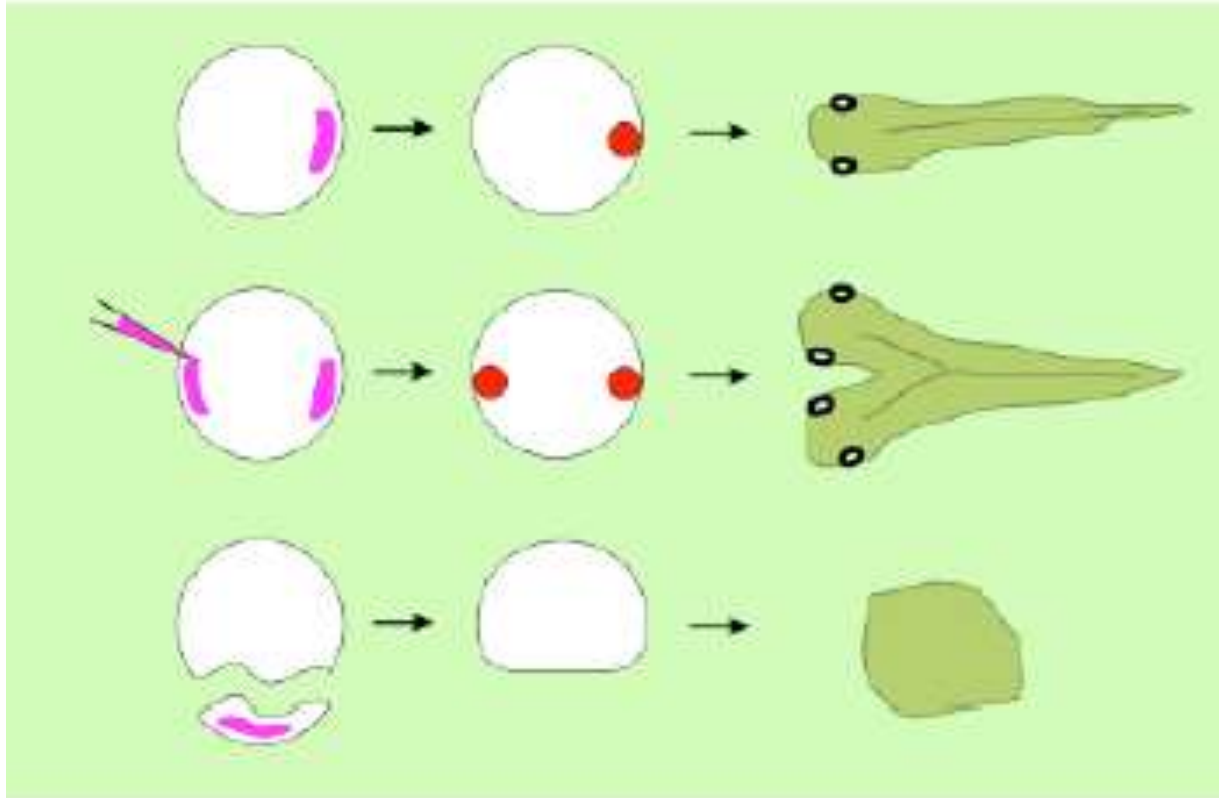
Document 10.

Analyses expérimentales des rôles du croissant gris et de la rotation de symétrisation.



Perrier C. et coll. Biologie tout en un, Dunod 2013.

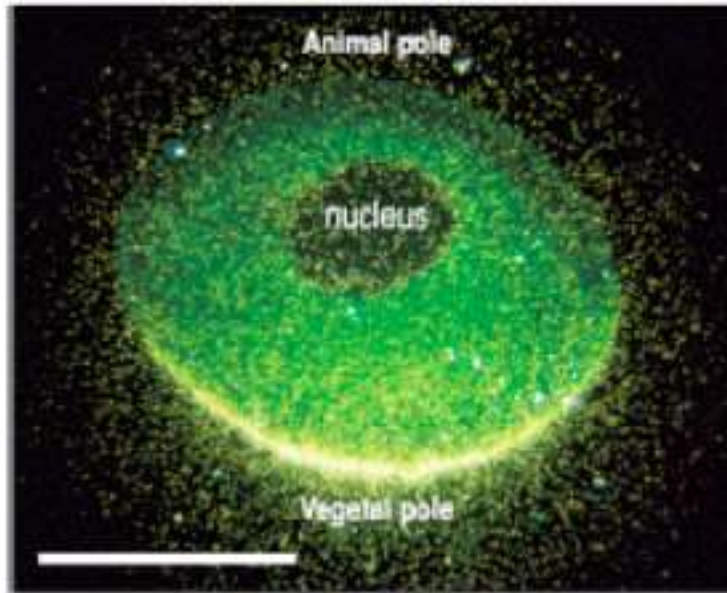
Document 11. Mise en évidence de l'activité dorsalisante du cytoplasme dorsal.



Le transfert du cytoplasme dorsal spécifie une nouvelle face dorsale

En absence de cytoplasme dorsal, l'embryon est ventralisé

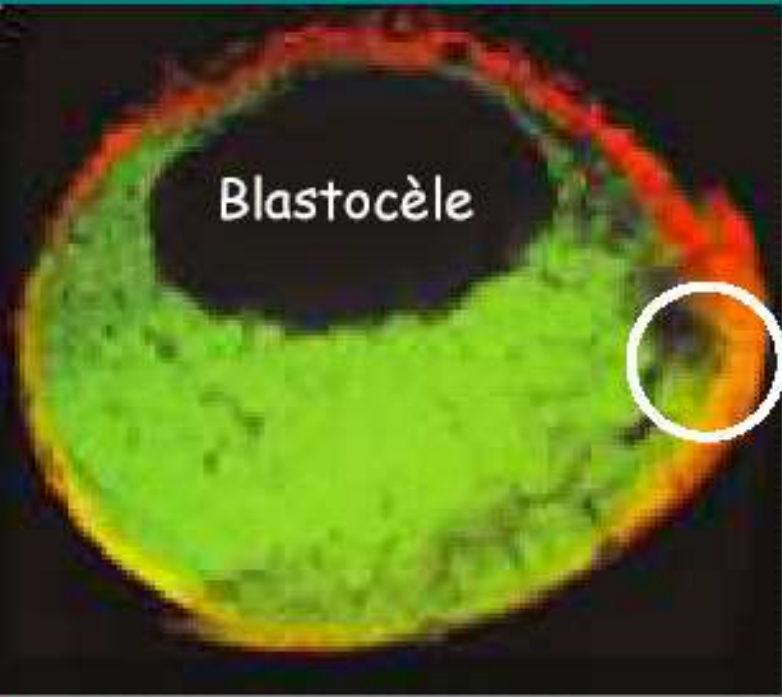
Les molécules candidates à l'activité dorsalisante



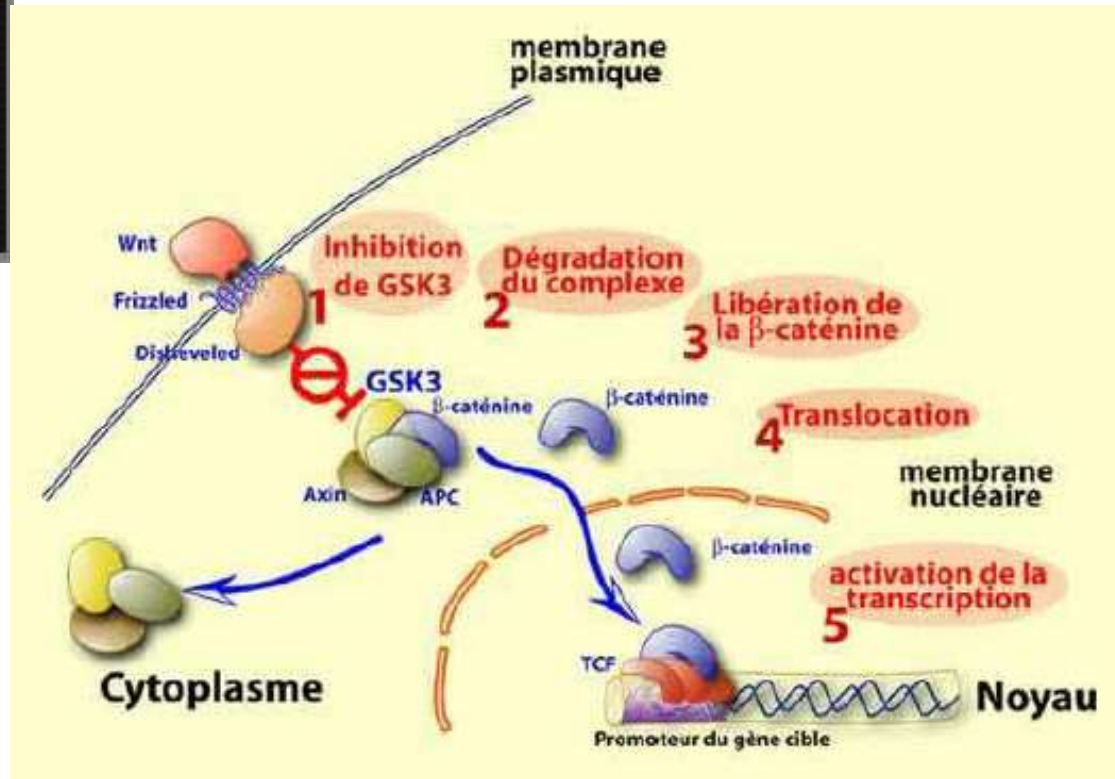
Les points brillants correspondent aux ARNms Vg1 détectés par hybridation *in situ*

- Plusieurs ARNms sont localisés dans le cortex végétatif de l'ovocyte et transloqués après la fécondation: Vg 1, XWnt, ...
- Des protéines traduites après la fécondation sont concentrées dans les cellules dorsales

La **technique d'hybridation *in situ*** utilise des sondes d'ADN complémentaires de l'ARN que l'on cherche à repérer. Les sondes sont ici marquées par une substance fluorescente.



Localisation de la β - caténine
au début de la gastrulation



Crédit photographique:

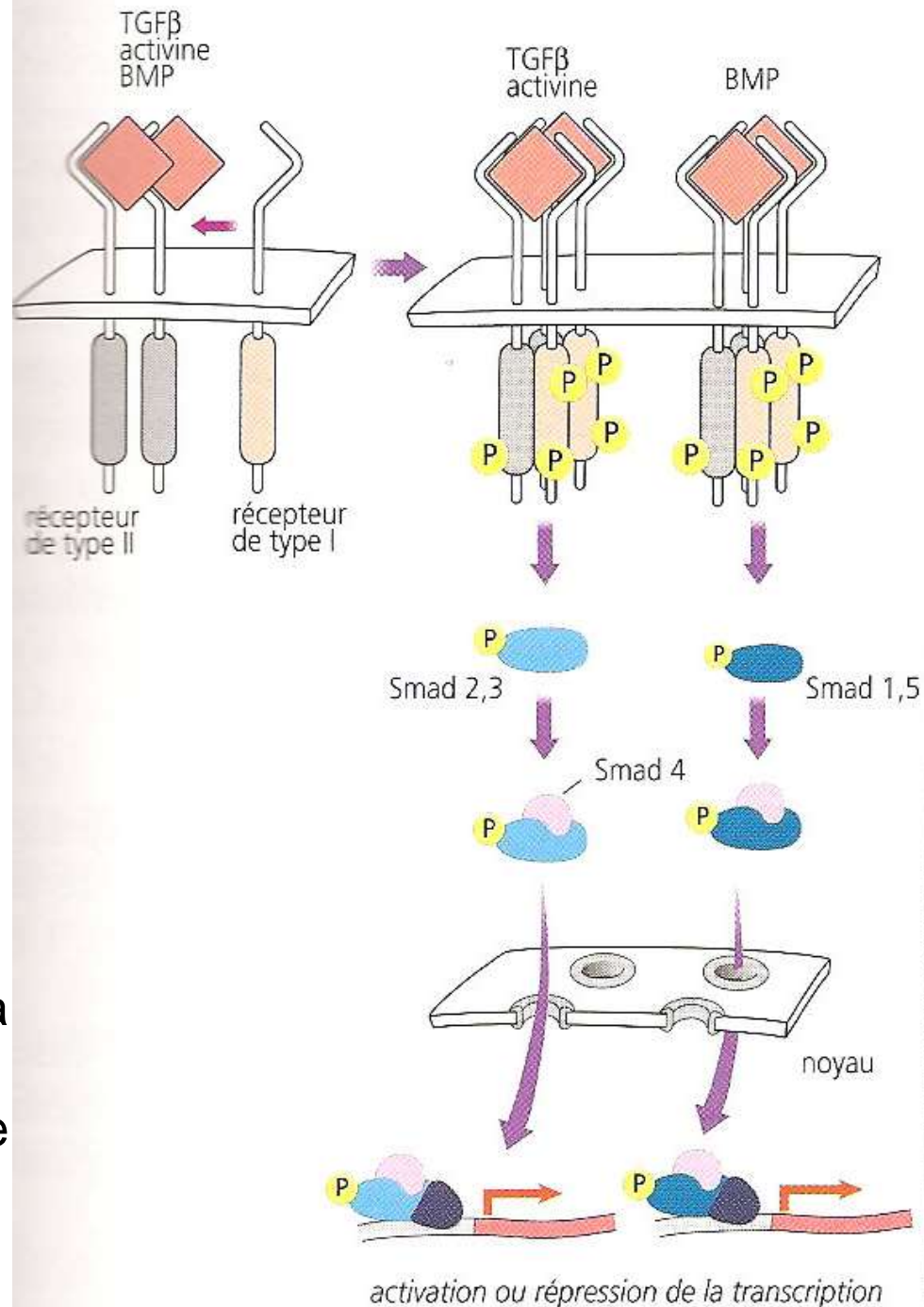
Christophe Magnan
Professeur Université Paris 7

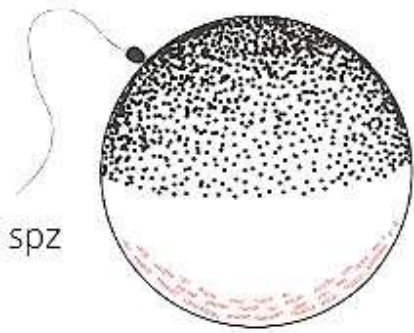
La β - caténine,
facteur de transcription

Mode d'action des facteurs de croissance de la famille des TGF : Activine, BMP...

Leur liaison à des récepteurs spécifiques entraîne leur hétérodimérisation et la phosphorylation de domaines cytoplasmiques.

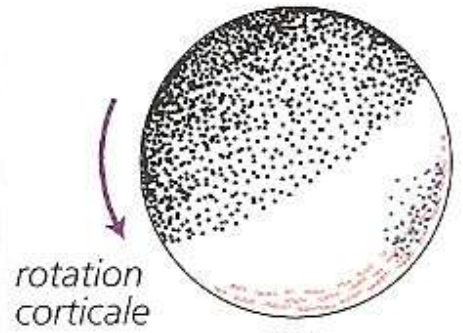
Ceux-ci recrutent et activent des protéines cytoplasmiques qui forment à leur tour des complexes qui, après translocation dans le noyau, joueront le rôle de facteurs de transcription.





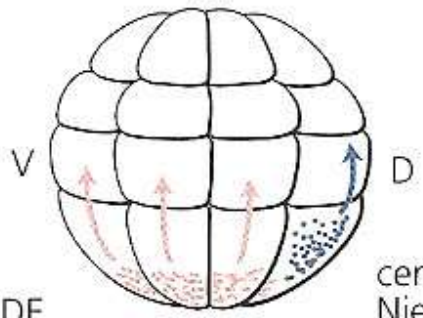
Des ARNm (Vg1 et Veg T) et des protéines (Dsh) sont concentrés dans le cortex de l'hémisphère végétatif.

PV
fécondation
PA



La rotation corticale déplace et active les ARNm et les protéines dans la région dorso-végétative.

PV
segmentation
PA



STADE
32 CELLULES

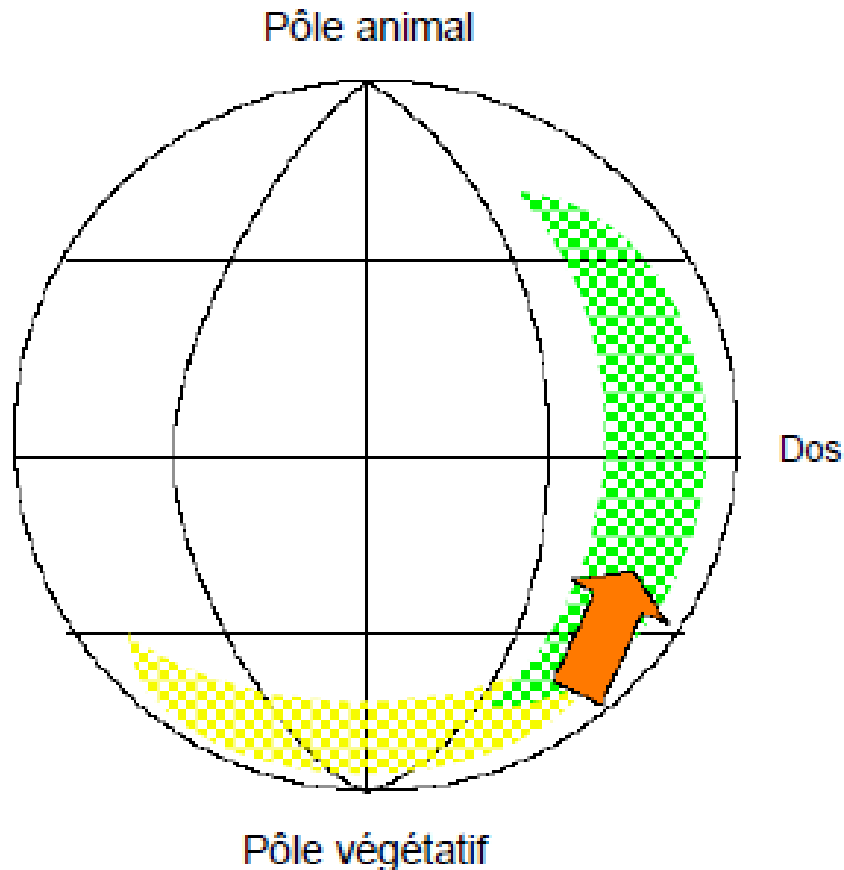
centre de Nieuwkoop,
β-caténine, Vg1, Veg T

Document 12. Modèle des interactions moléculaires induisant le mésoderme.

Premières étapes : redistribution des déterminants cytoplasmiques et domaines de répartition des protéines.

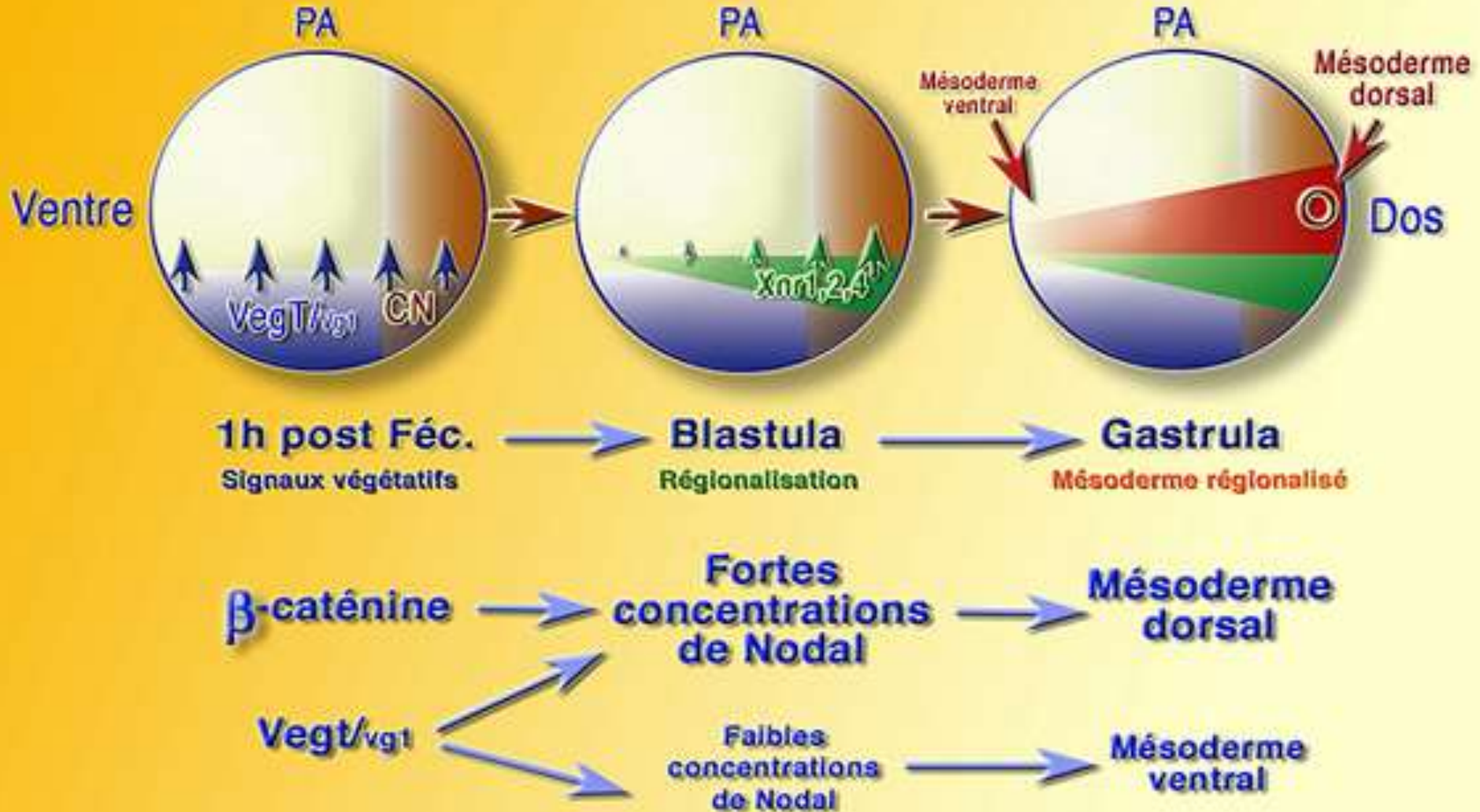
T. Darribère, Introduction à la biologie du développement, Ed. Belin 2002.

Les domaines de répartition des molécules inductrices permettent leur action conjuguée dans certaines régions



- L'action conjuguée d'un déterminant dorsal, la β -caténine et d'un déterminant végétatif (Vg 1 ou Veg T) active l'expression des Xnrs (Xenopus nodal-related, famille des TGFB) uniquement dans la région dorsale de l'embryon
- Les protéines Xnrs activent des gènes qui s'expriment uniquement dans les cellules de la zone marginale dorsale (siamois)

Modèle de l'induction mésodermique



Voir aussi : Document 12. Modèle des interactions moléculaires induisant le mésoderme.

Domaine d'expression de goosecoïd (à gauche) et chordin (à droite) en début de gastrulation

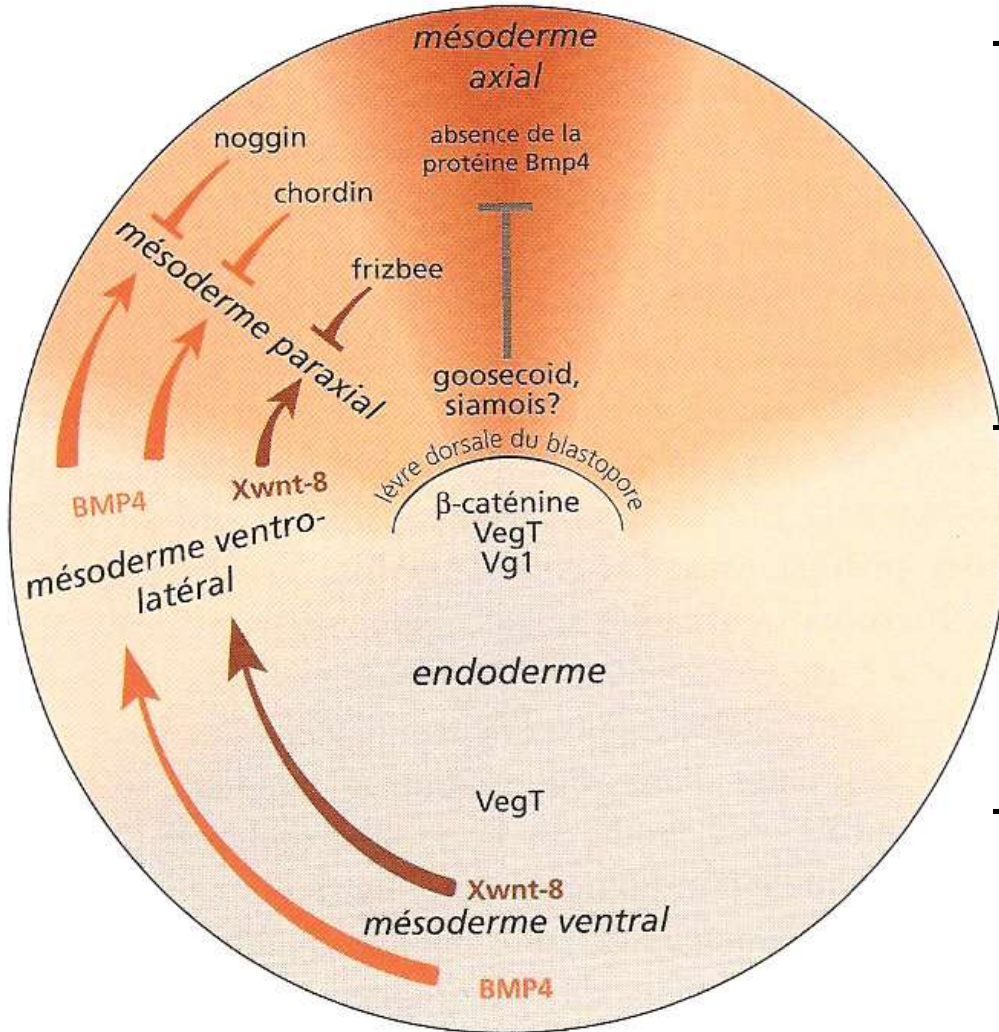


Les produits de l'expression de ces gènes sont localisés au niveau de la lèvre dorsale du blastopore, qui correspond au centre de Spemann. Chordin, protéine sécrétée, diffuse à partir du domaine d'expression.

L'utilisation de gènes rapporteurs permet de repérer les cellules qui expriment le gène étudié. Un gène rapporteur peut être fusionné au gène étudié ou mis sous le contrôle du promoteur de ce dernier.

Exemple : le gène GUS code pour la β – glucuronidase qui colore en bleu les cellules où le gène est actif.

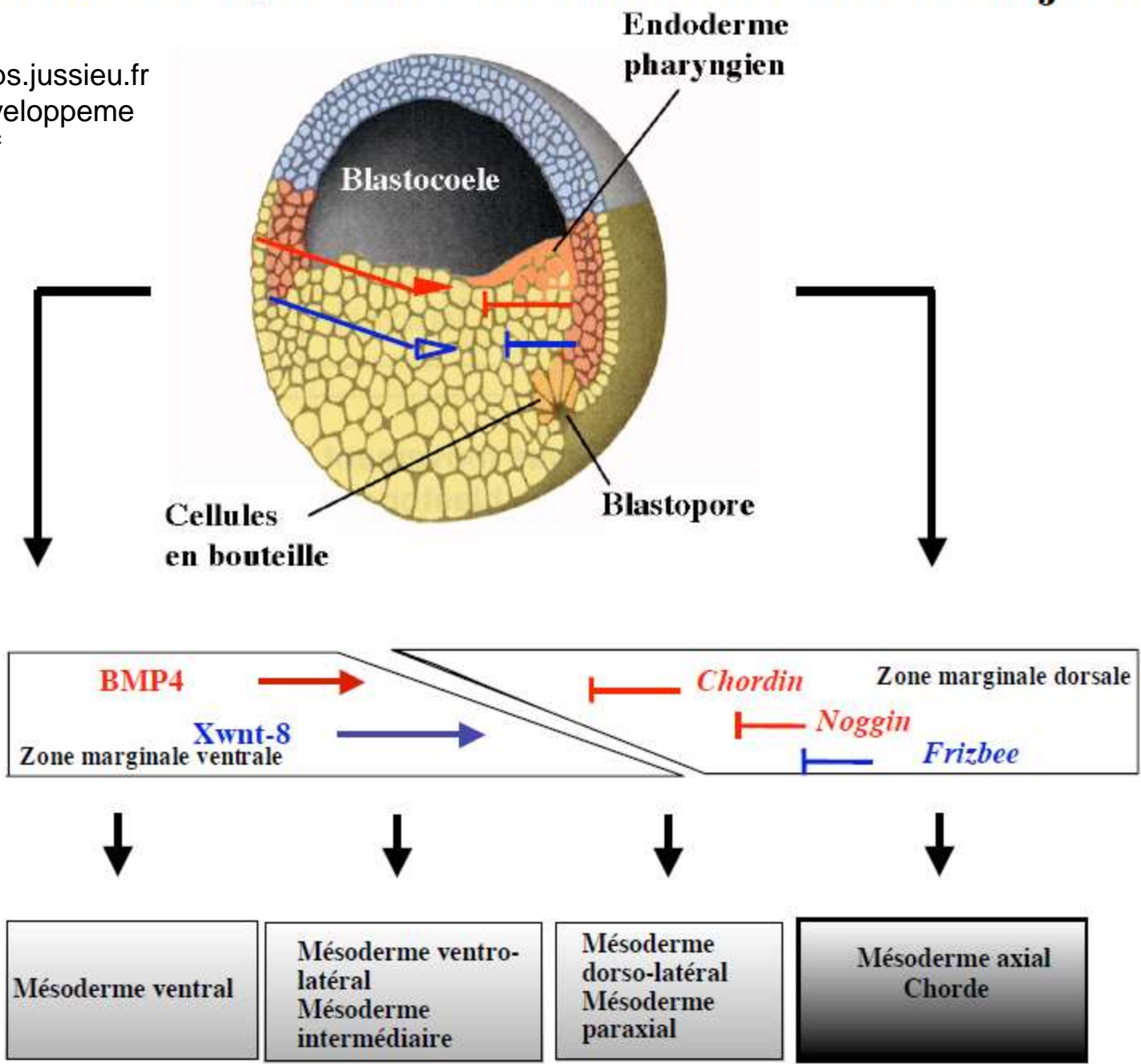
Rôle du centre de Spemann dans l'induction du mésoderme

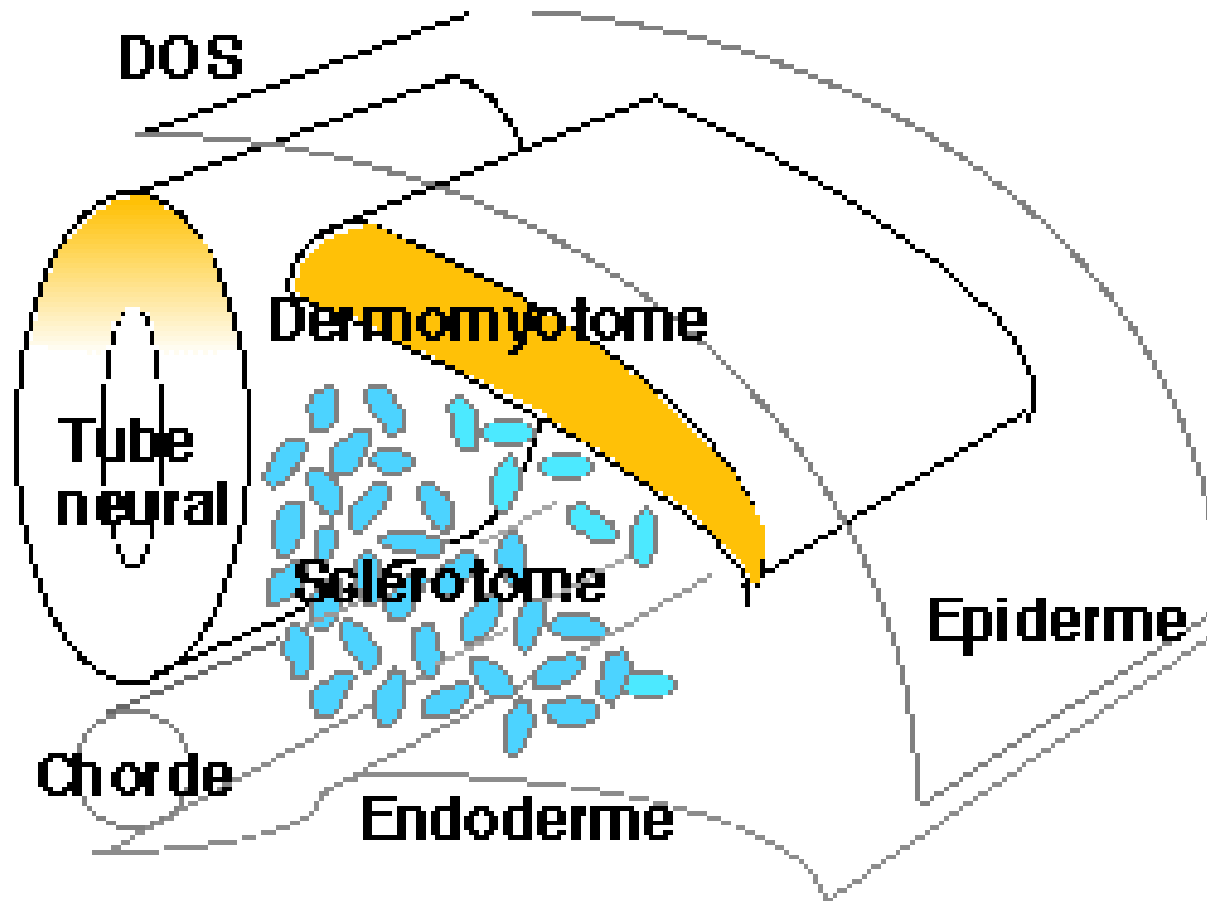


- L'expression de Goosecoïd (et de siamois ?) dans le centre de Spemann inhibe l'expression du gène Bmp4 → absence de BMP4, production de mésoderme axial
- Production et diffusion de noggin, chordin, frizbee à partir du centre de Spemann → blocage de BMP4 et Xwnt-8, production de mésoderme paraxial
- Production et diffusion de BMP4 et XWnt-8 par la zone marginale ventrale et latérale → production de mésoderme ventral et latéral

Le centre de Spemann dorsalise le mésoderme adjacent

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/bioduveloppement/chapitre6.pdf>





Expression régionalisée des gènes Pax dans le tube neural et les somites de l'embryon de Poulet.

En jaune : domaine d'expression de Pax3

En bleu : domaine d'expression de Pax1

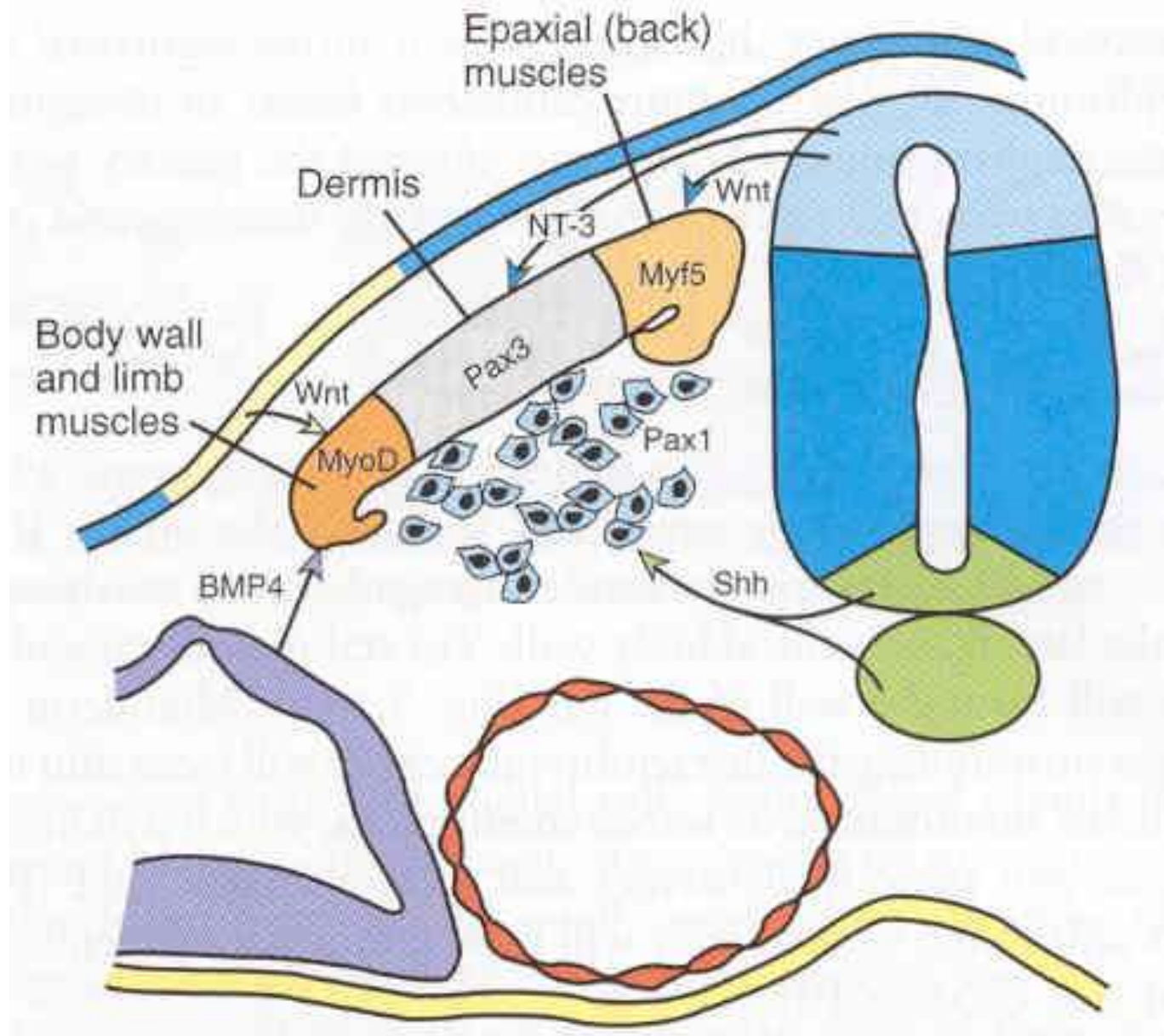
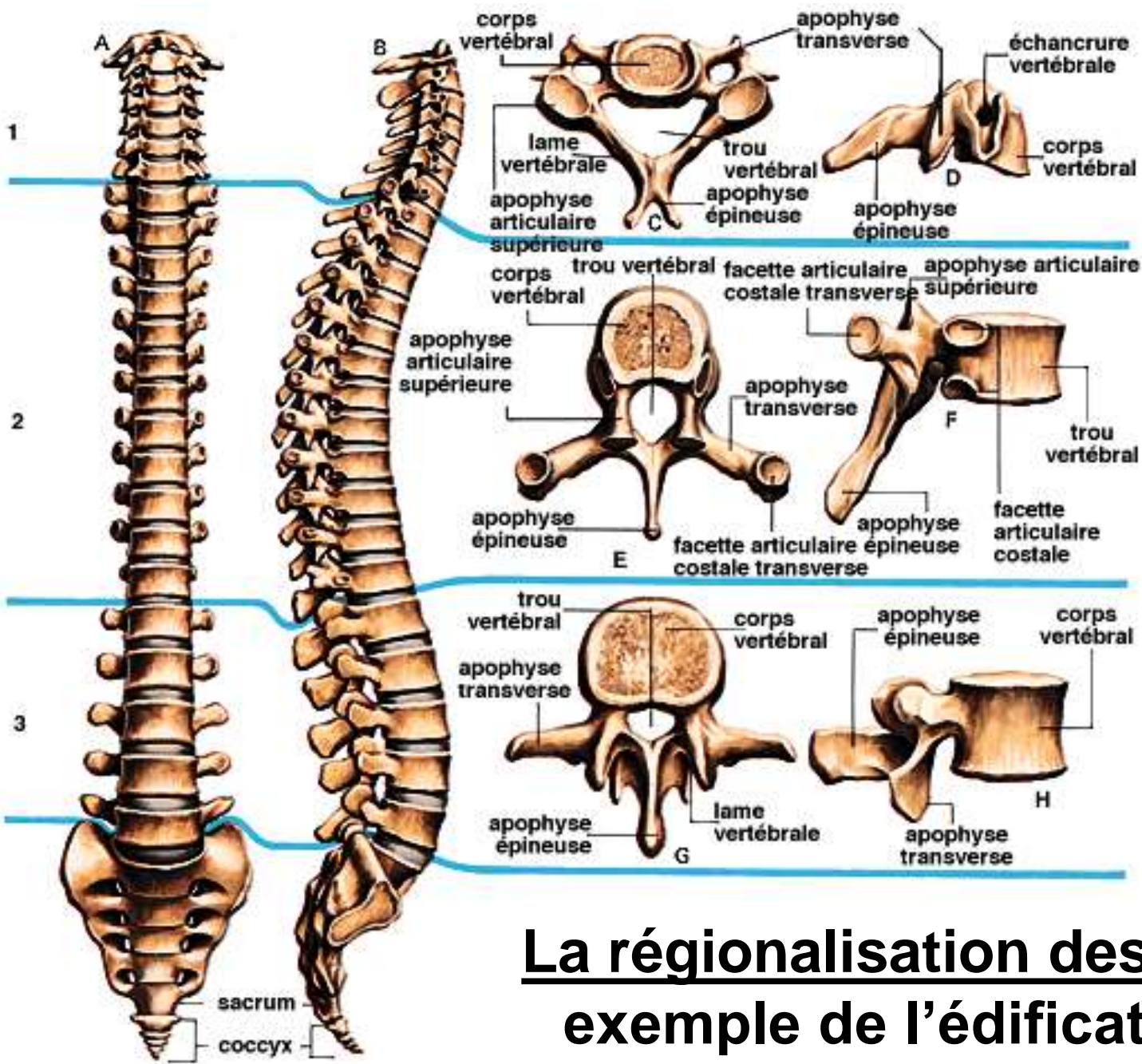
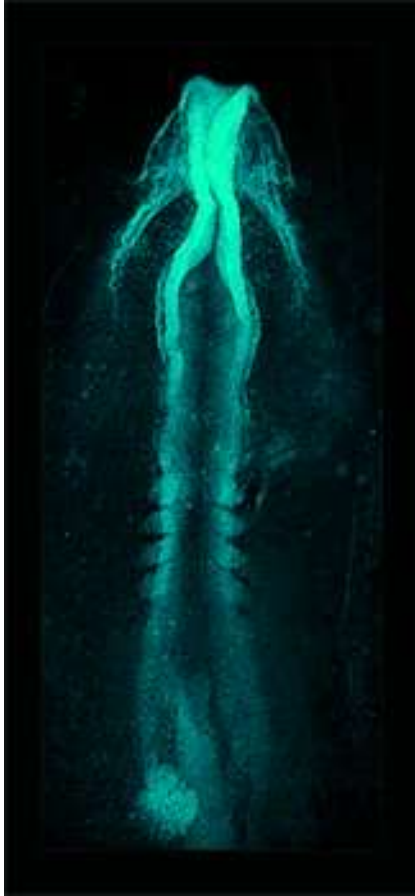


Schéma très simplifié de la détermination des dérivés des somites



**La régionalisation des somites :
**exemple de l'édification de la
 colonne vertébrale****

Formation des somites lors du développement de l'embryon de Poulet



A gauche : à 25-26 h, les bourrelets neuraux céphaliques sont affrontés (neurulation), le mésoderme dorsal commence à se découper en somites.

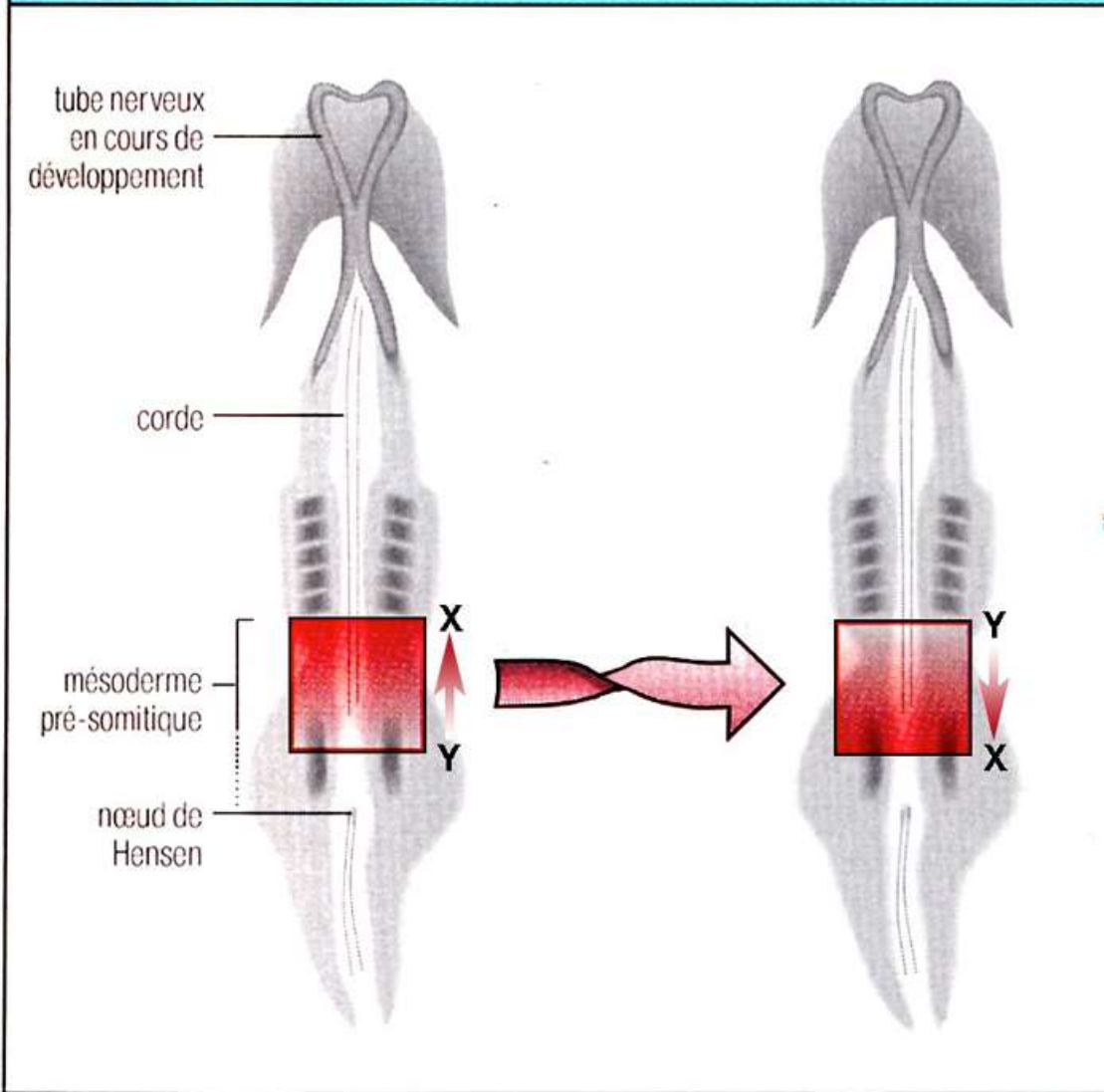
A droite : à 38 h d'incubation, la neurulation se poursuit et on reconnaît dans la région antérieure le cerveau passant du stade 3 au stade à 5 vésicules, avec les vésicules optiques latéralement.

Une dizaine de somites est formée.

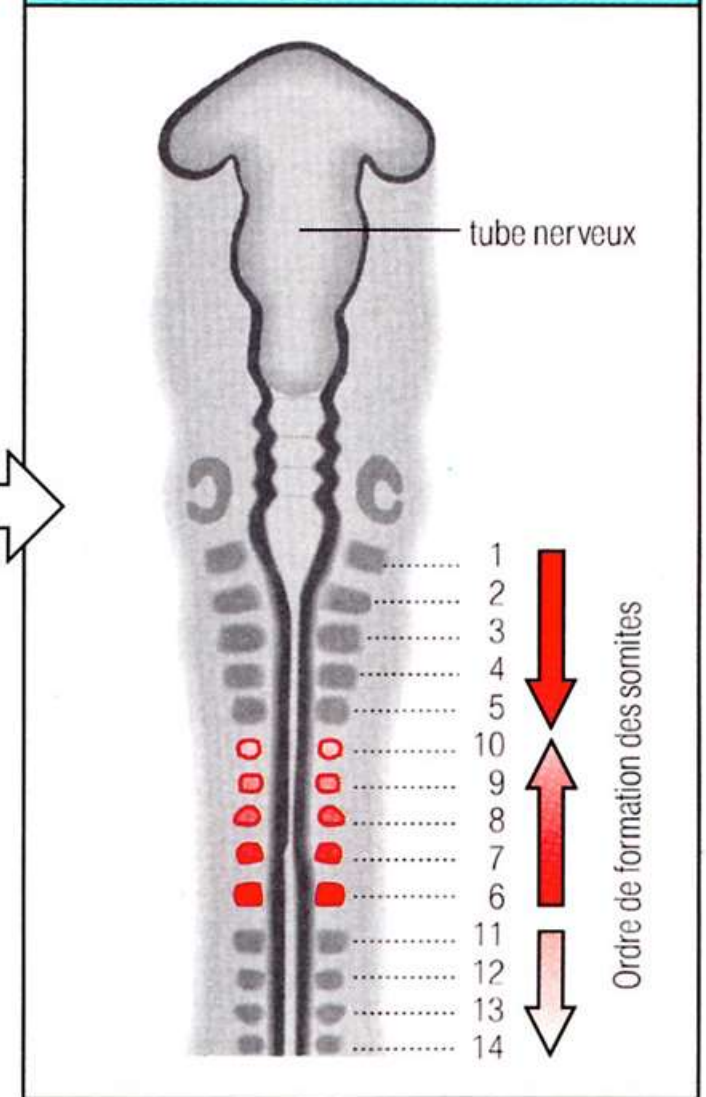


Expérience d'inversion des somites

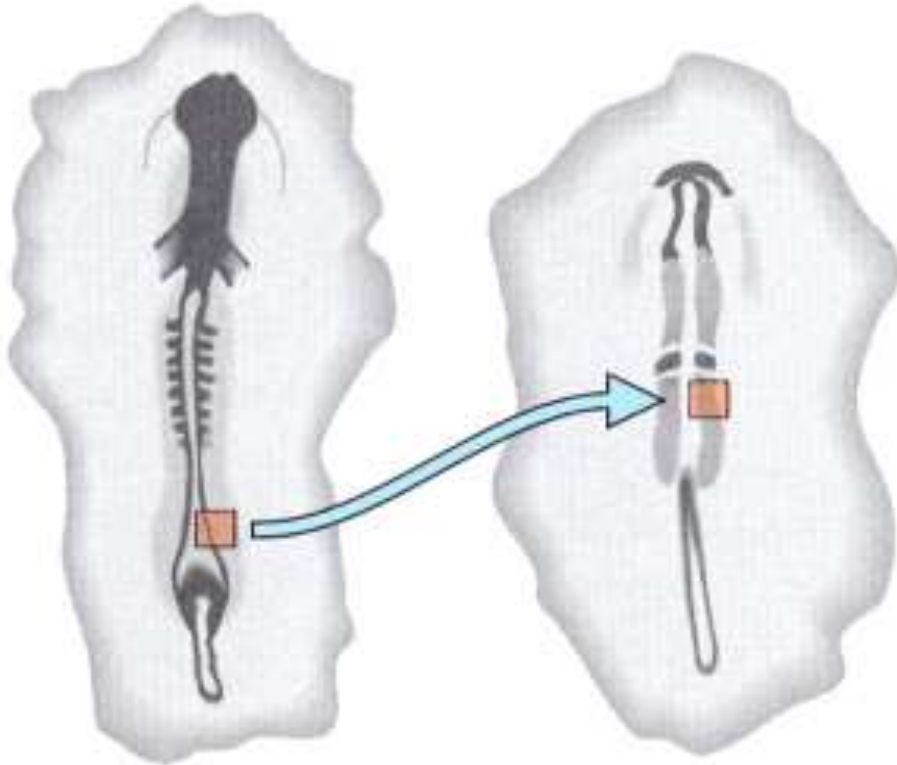
Inversion du mésoderme pré-somitique



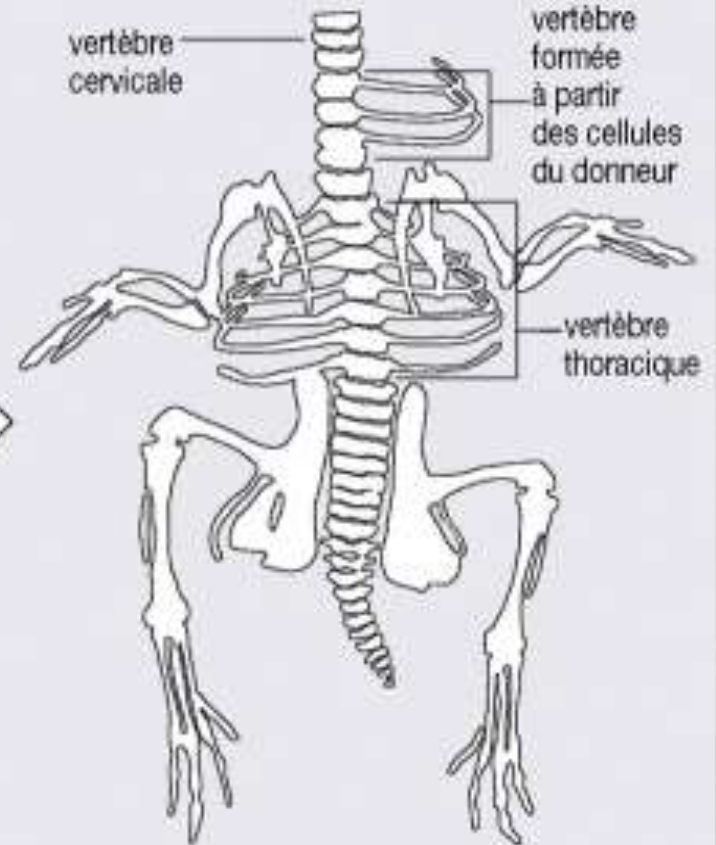
Formation des somites en ordre inverse



Du mésoderme pré-somitique provenant de la région de formation des vertèbres thoraciques est prélevé sur un embryon de poulet au stade 10 et transplanté dans la région cervicale d'un embryon au stade 8



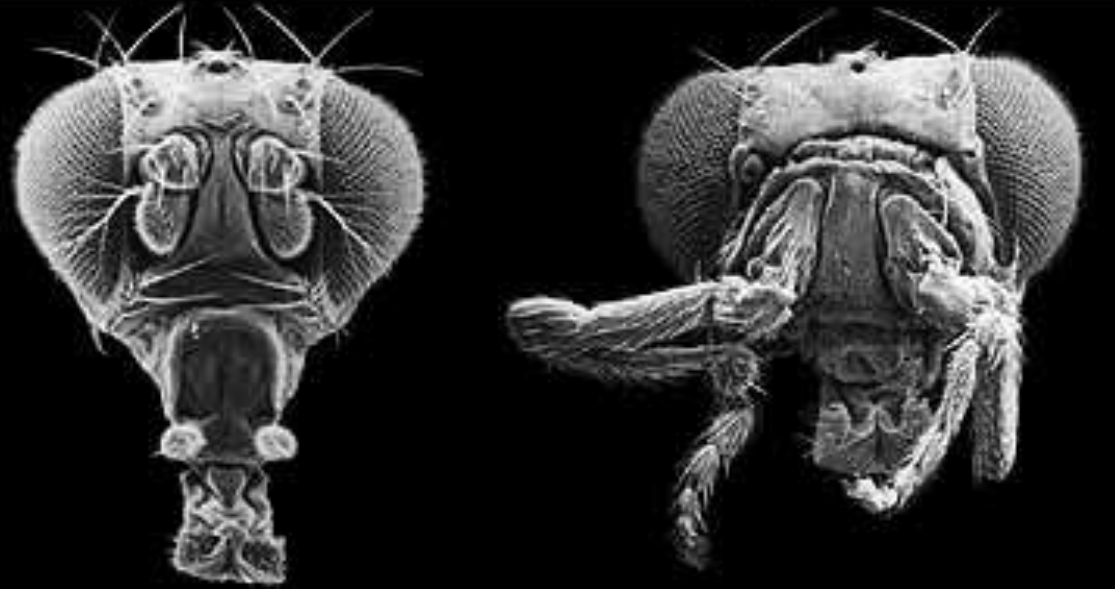
Le squelette de l'embryon-hôte à 9 jours montre le développement de vertèbres thoraciques dans la région cervicale



Mise en évidence de l'identité de position du mésoderme présomitique chez l'embryon de Poulet.

wild-type *Drosophila*

antennapedia mutant



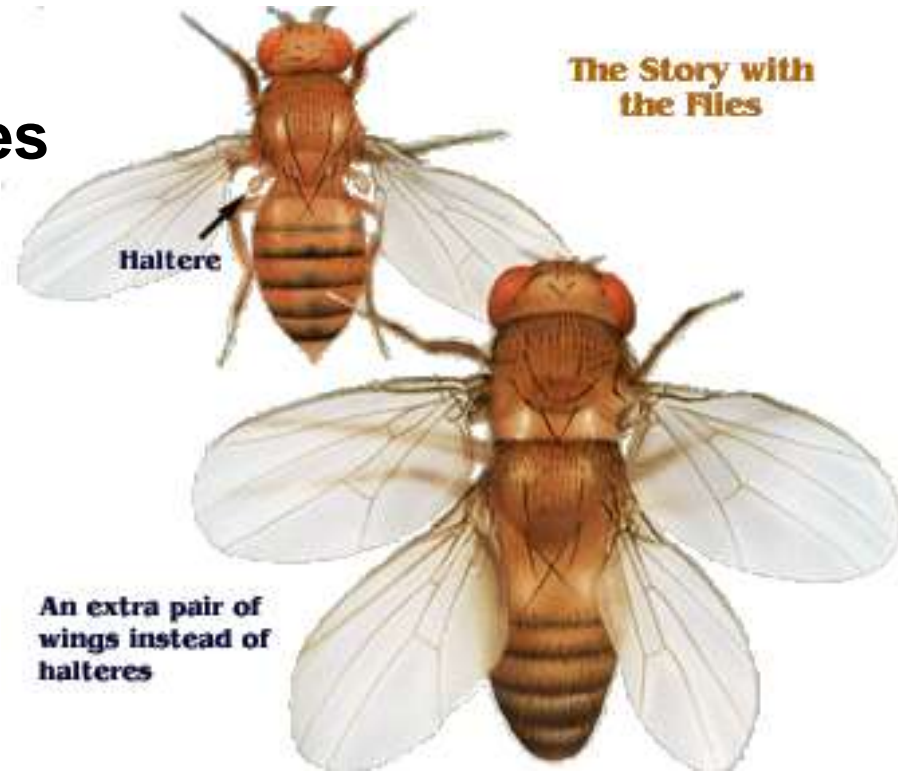
Faces antérieures de têtes de drosophile de type sauvage (A) et mutante homéotique (B).

La mutation *Antennapedia* a modifié les antennes en pattes. MEB.

Des mutations mettant en évidence les gènes homéotiques chez la *Drosophila*.

Drosophila mutante homéotique pour le gène *Ultrabithorax*.

Cette mutation transforme le troisième segment thoracique en un deuxième segment thoracique.



Document 13.

Localisation et domaines d'expression des gènes à homéoboîte.

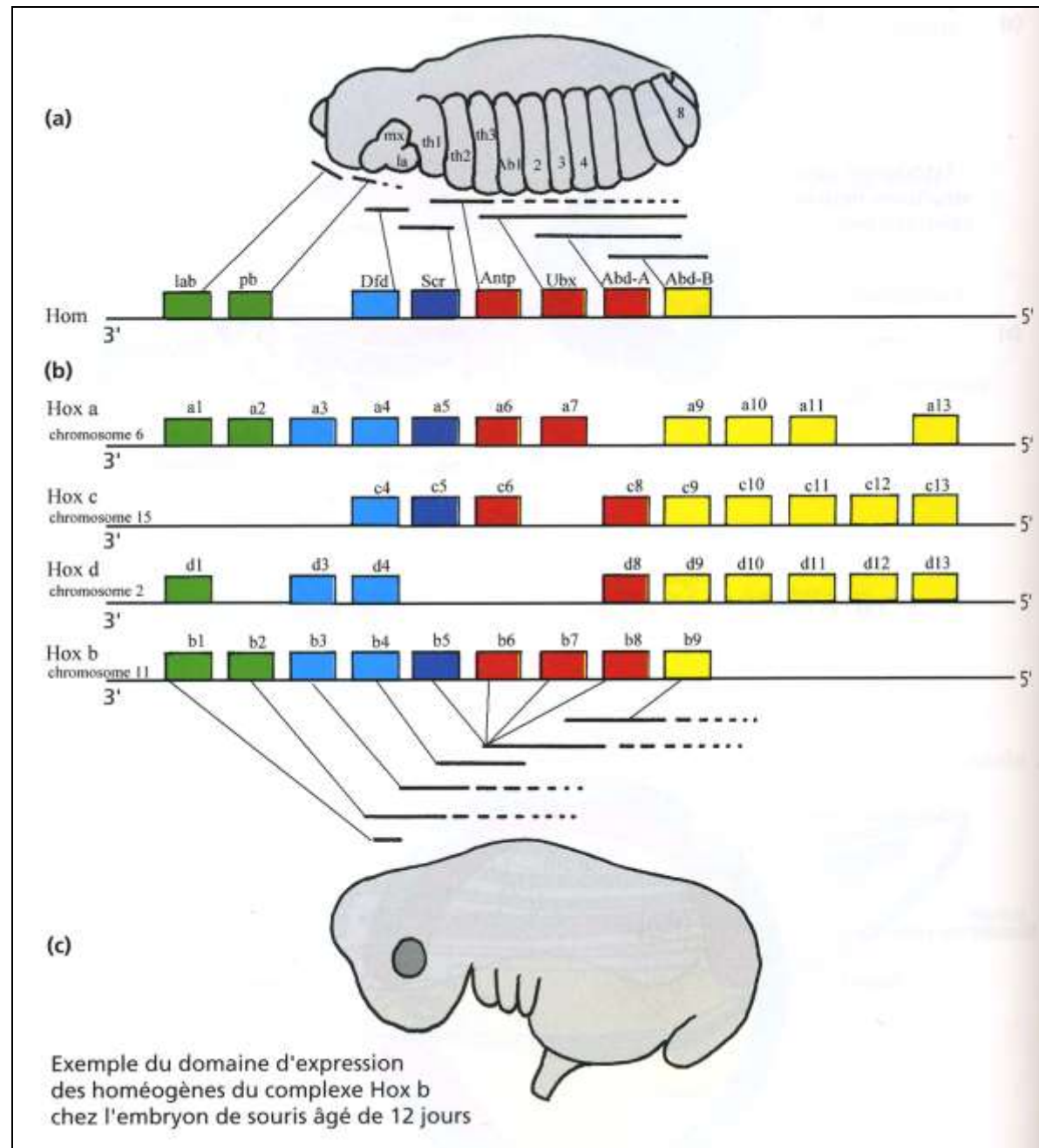
a. Gènes Hom chez la Drosophile,

b. Gènes Hox chez la Souris,

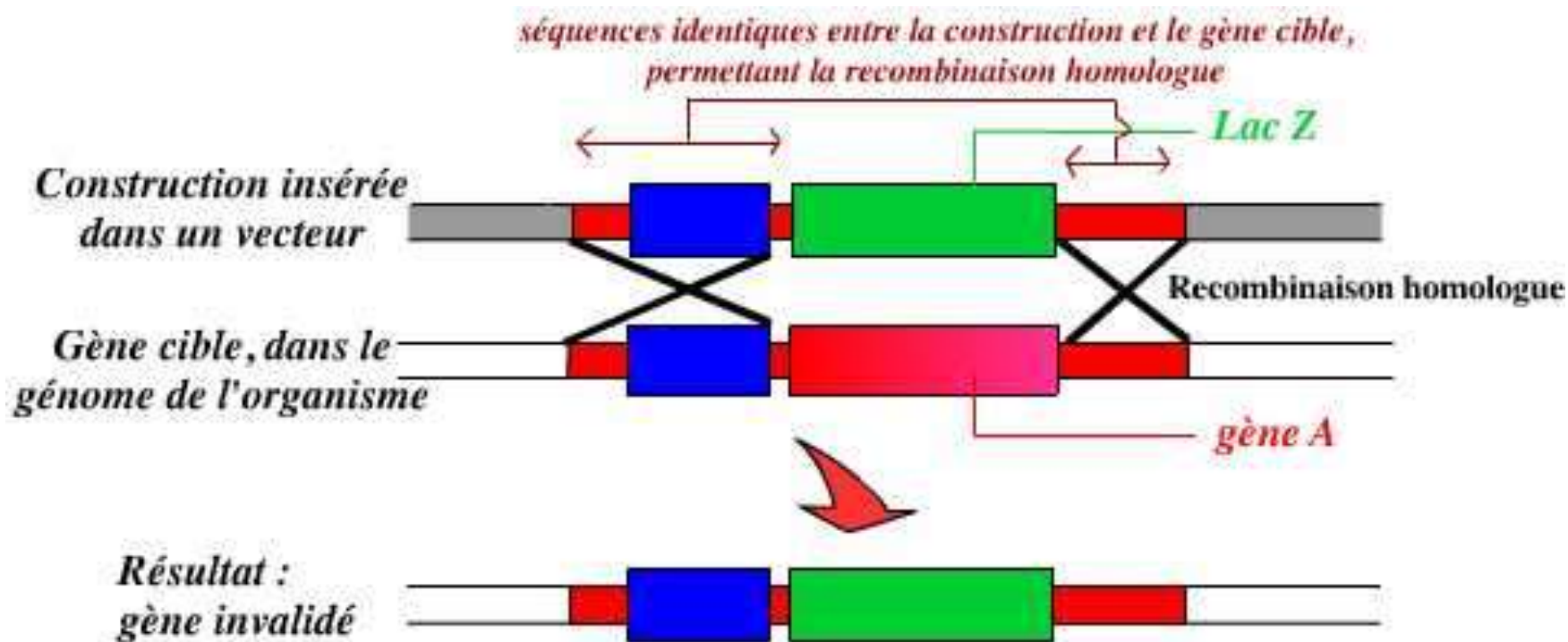
c. Expression des gènes Hox chez la Souris.

Les gènes qui dérivent probablement d'un même gène ancestral sont représentés de la même couleur.

[PEYCRU P. et coll., " Biologie 1^{ère} année BCPST ", Dunod Ed., 2007].



Rappel : la technique d'invalidation d'un gène ou Knock out



Elle consiste à remplacer les deux copies d'un gène, dans le génome de l'organisme, par un autre allèle (le plus souvent, inactif).

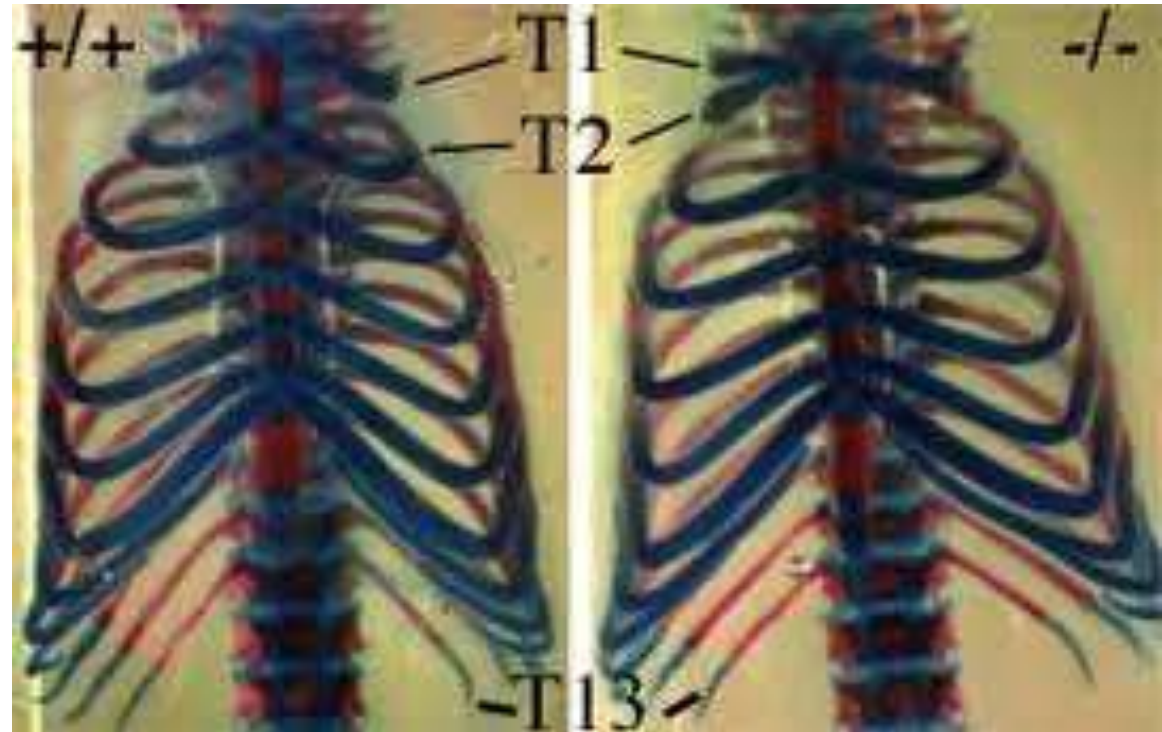
Cette technique est basée sur la recombinaison homologue entre un vecteur et le génome d'une cellule souche embryonnaire. Une fois modifiée, cette cellule est injectée dans de très jeunes embryons de souris : il en résulte des souris mosaïques. Celles dont la lignée germinale est modifiée sont sélectionnées puis croisées pour obtenir des homozygotes pour le gène invalidé.

Cages thoraciques d'une jeune souris sauvage (+/+) et d'une souris KO pour Hox B8 (-/-) vues de face.

L'inactivation de Hox B8 conduit à plusieurs défauts de développement, en particulier à une fusion partielle des deux premières côtes.

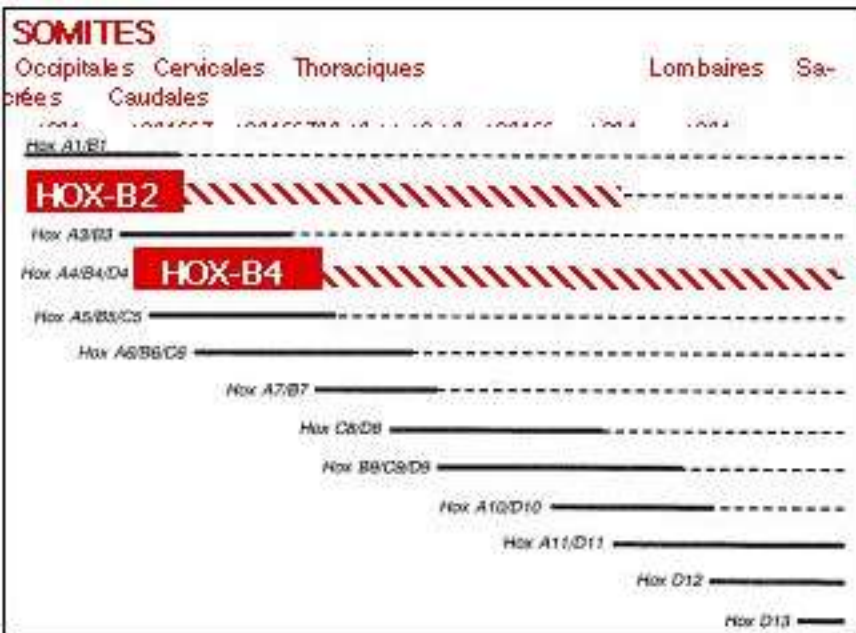
Ceci correspond à un changement d'identité des vertèbres (qui portent les côtes) : la deuxième vertèbre thoracique (T2) "prend l'identité" de la première vertèbre thoracique (T1). C'est ce changement qui conduit à la fusion partielle de côtes.

En plus de ce changement d'identité T2 vers T1, on détecte aussi souvent une modification de la première vertèbre thoracique (T1) vers une identité de 7^e vertèbre cervicale (C7) adjacente.

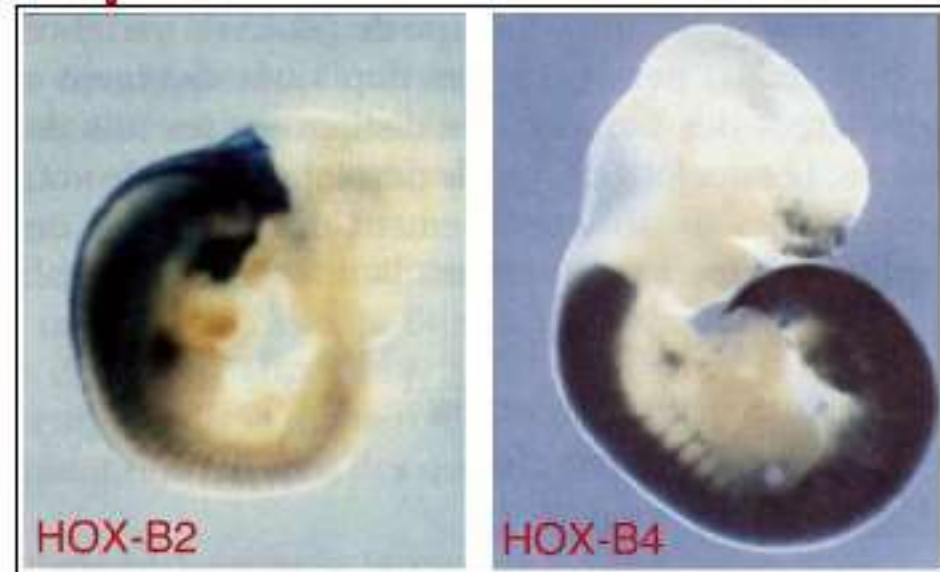


La technique du Knock Out a été utilisée ici : le gène HoxB8 a été remplacé par le gène Lac Z, dont l'expression produit la β -galactosidase, facilement détectable par une réaction colorée. On peut alors connaître précisément les lieux où s'exprime normalement HoxB8.

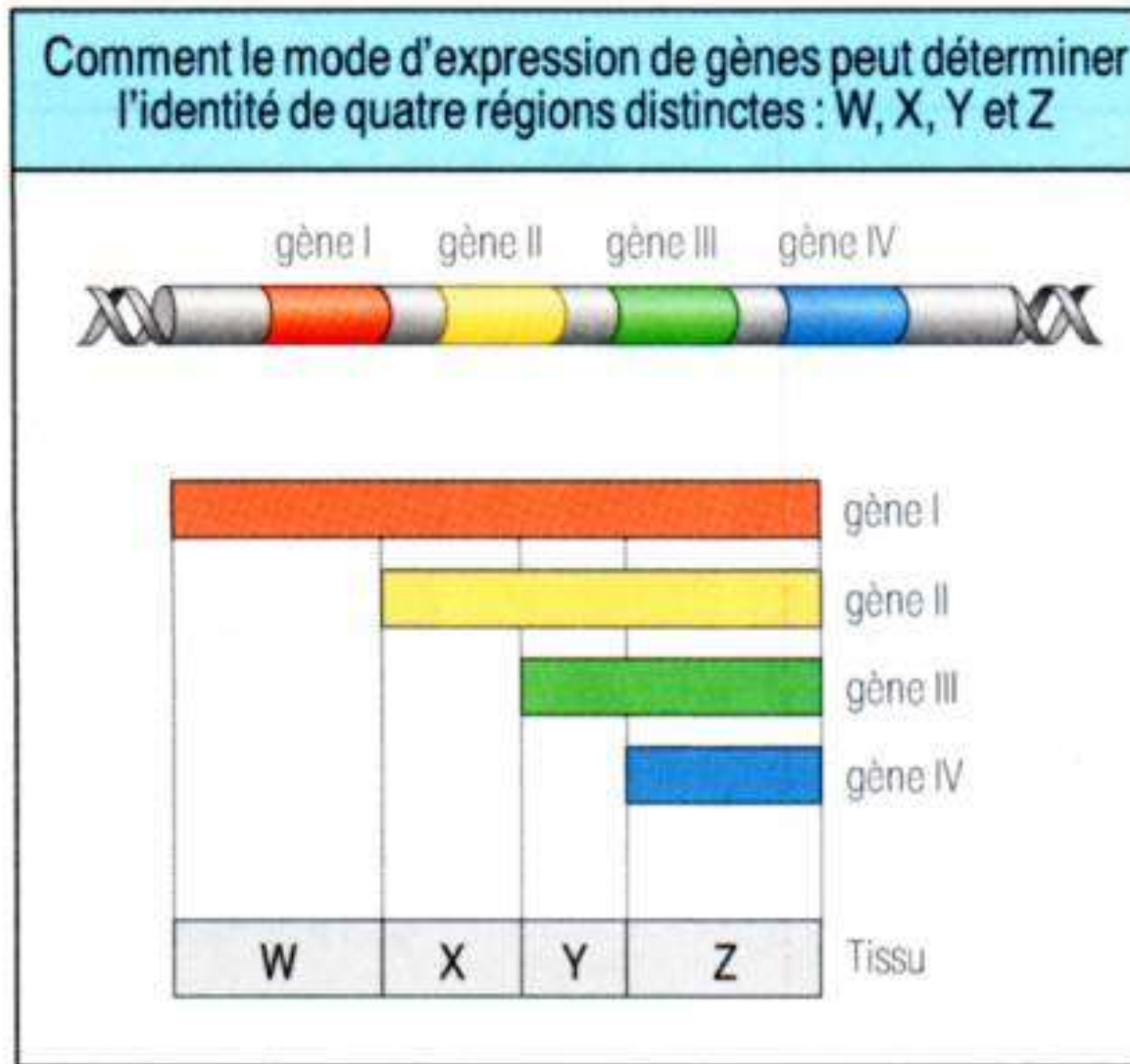
Domaines d'expression de gènes Hox-B2 et Hox-B4 chez la Souris



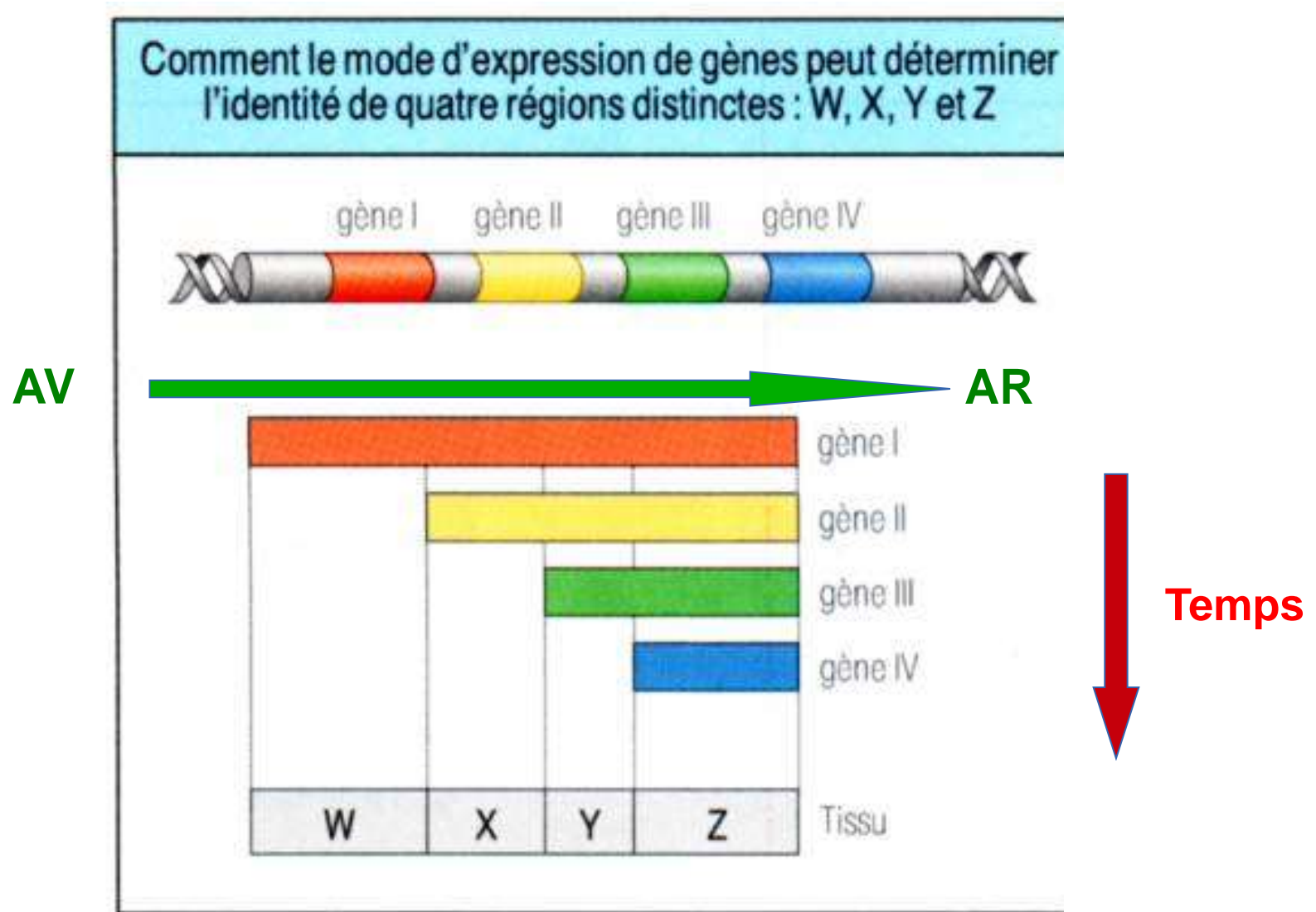
La mise en évidence des territoires d'expression des gènes a ici été réalisée par hybridation in situ utilisant des sondes marquées d'ADN complémentaire.



La détermination de valeurs de position par l'activité des gènes



La détermination de valeurs de position par l'activité des gènes



Document 13.

Localisation et domaines d'expression des gènes à homéoboîte.

a. Gènes Hom chez la Drosophile,

b. Gènes Hox chez la Souris,

c. Expression des gènes Hox chez la Souris.

Les gènes qui dérivent probablement d'un même gène ancestral sont représentés de la même couleur.

[PEYCRU P. et coll., " Biologie 1^{ère} année BCPST ", Dunod Ed., 2007].

