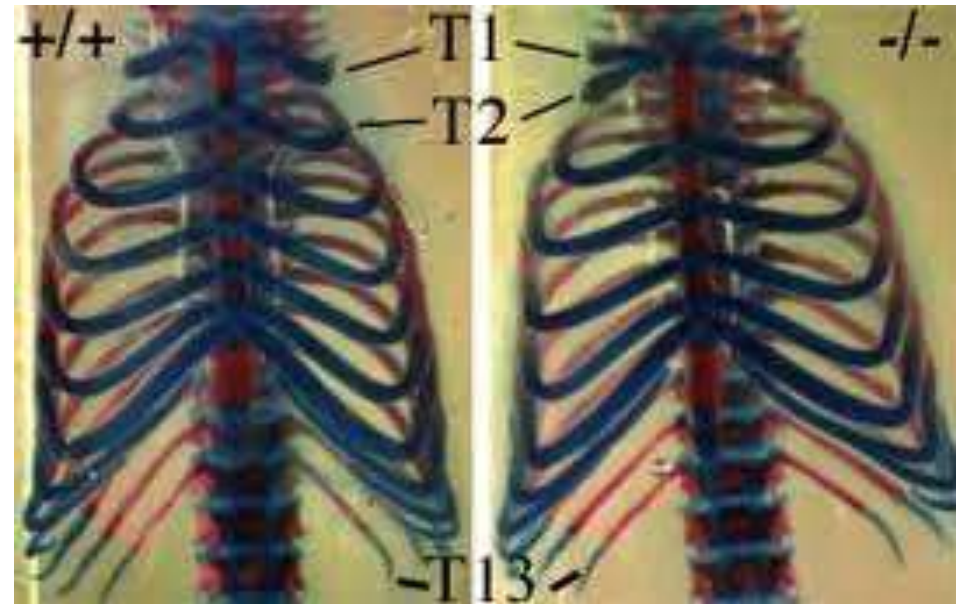


Partie II – D :
Ontogenèse et
reproduction
Chapitre II – D – 2b :
Le contrôle du
développement
embryonnaire

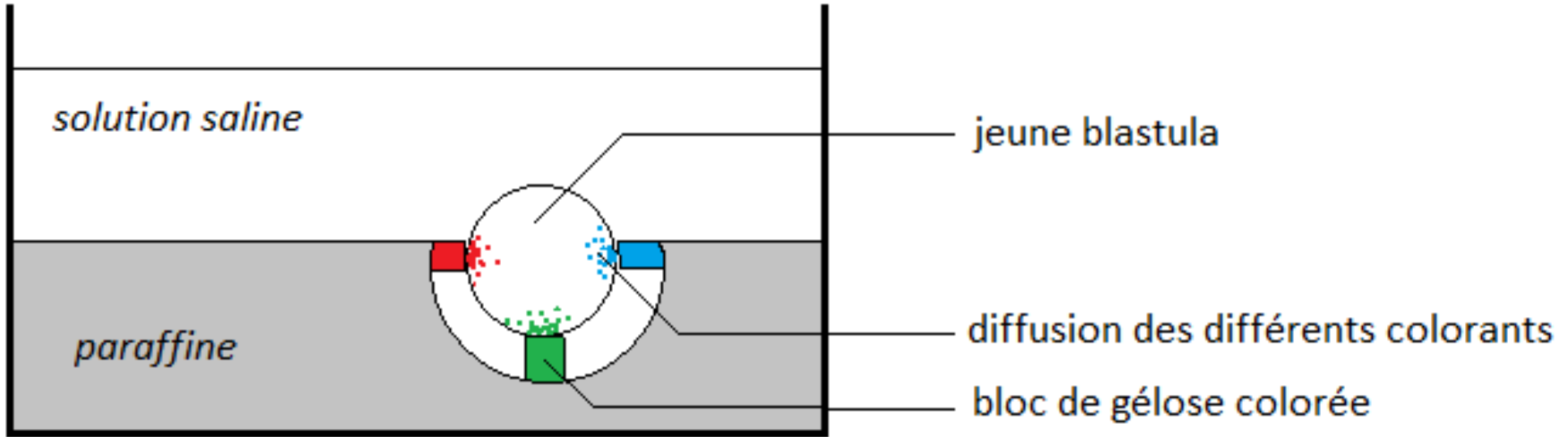


wild-type *drosophila*

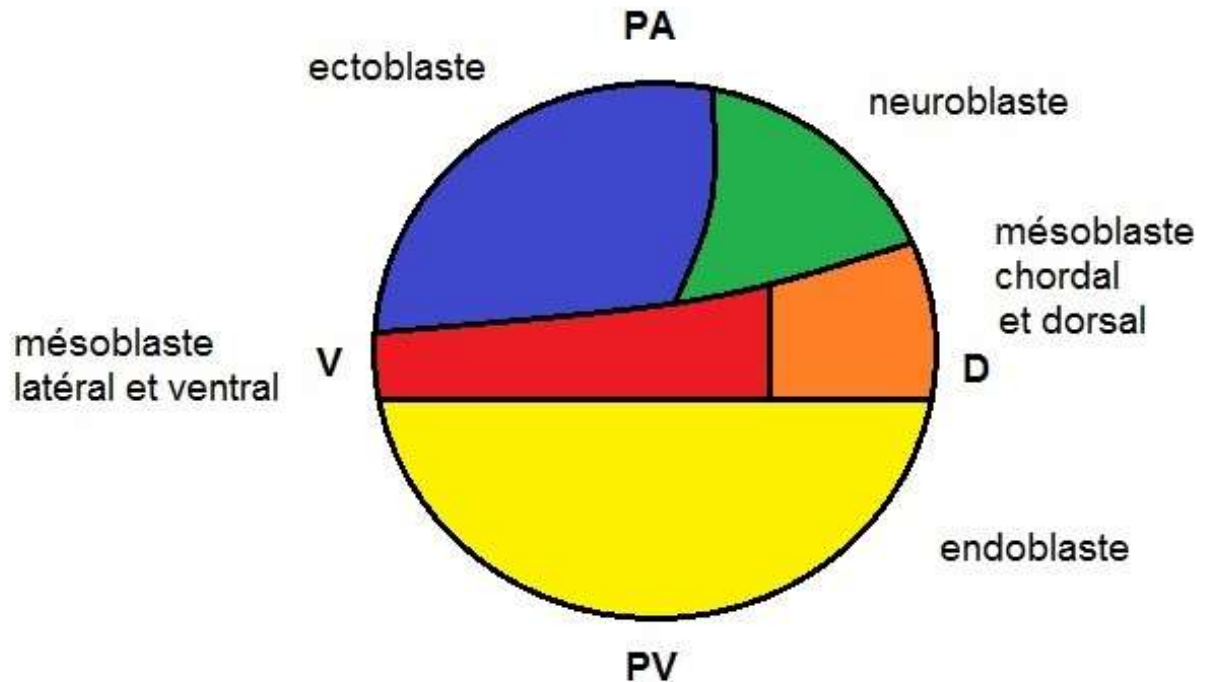
antennapedia mutant



Technique des marques colorées (Vogt, 1925)



Carte des territoires présomptifs de la blastula de Xénope



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



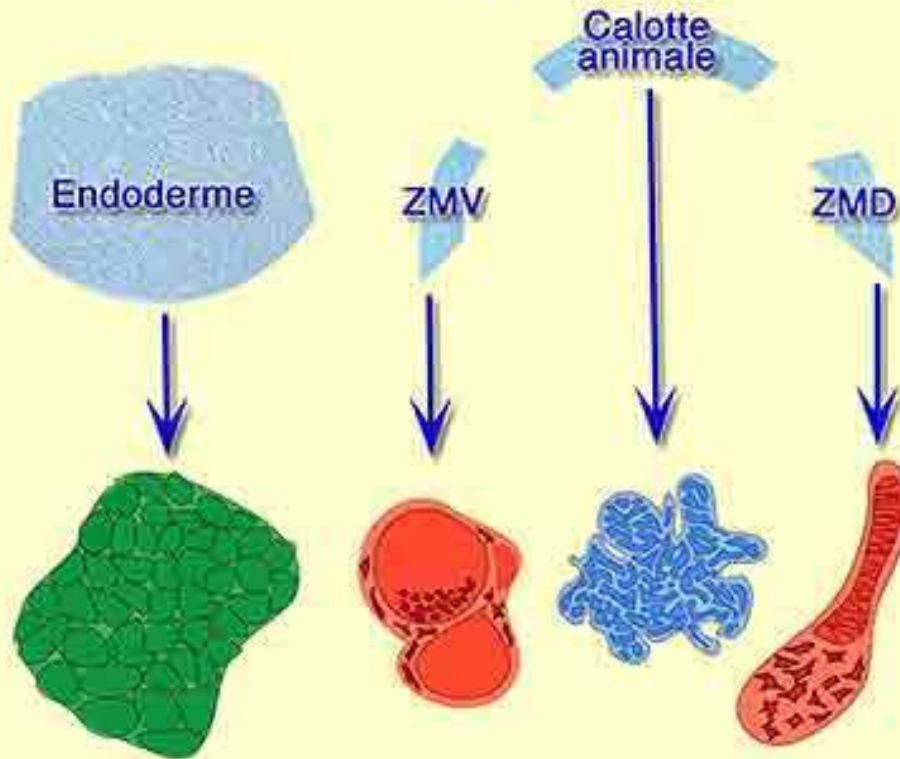
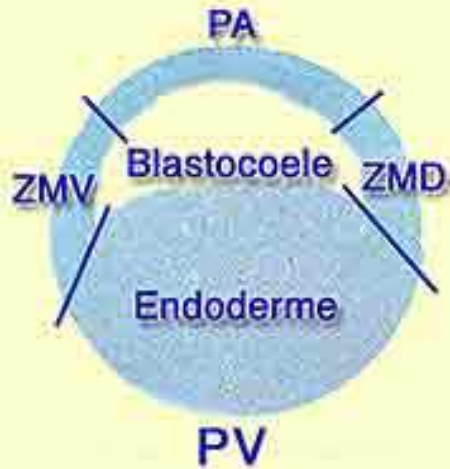
Les techniques modernes utilisent des composés fluorescents pour marquer les cellules de l'embryon.

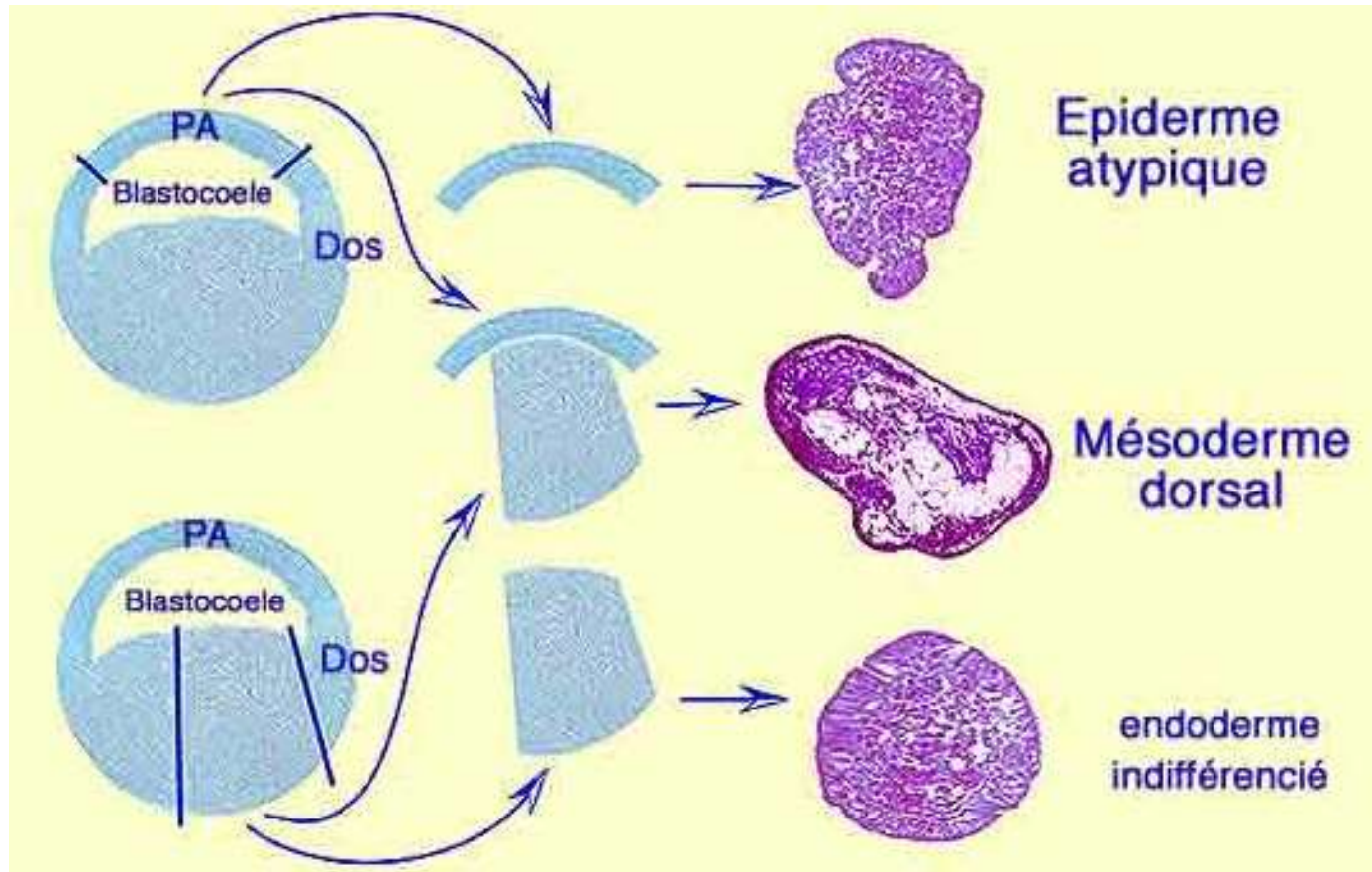
Document 1. Expériences de Nieuwkoop : mise en culture d'explants de blastula isolément.

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 :

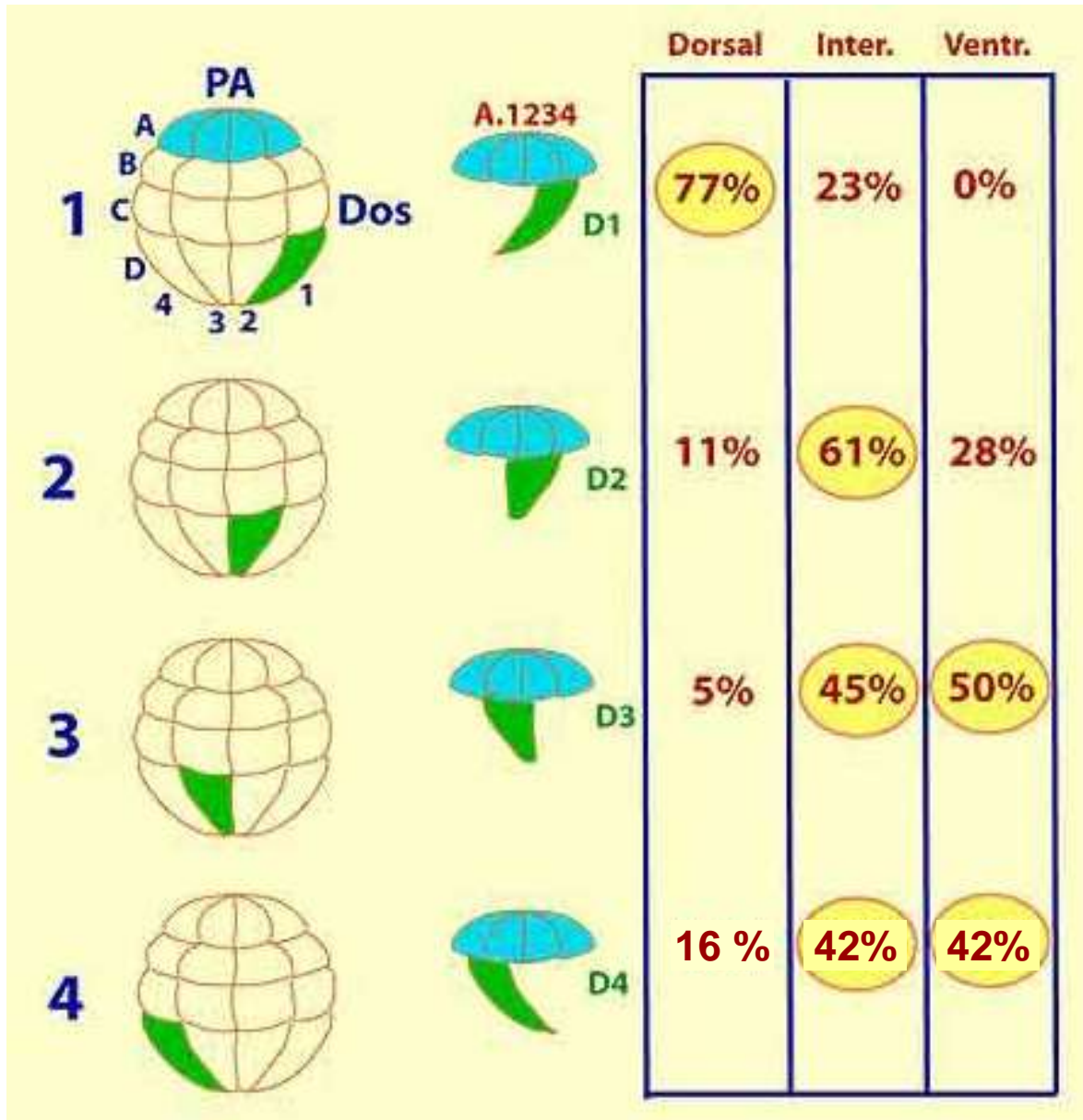
- calotte ectodermique --> épiderme atypique
- zone marginale dorsale --> mésoderme de type dorsal (chorde, somites)
- zone marginale ventrale --> mésoderme de type ventral (vésicules rappelant le cœlome entouré par les lames latérales, cellules sanguines)
- cellules endodermiques --> endoderme indifférencié





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.

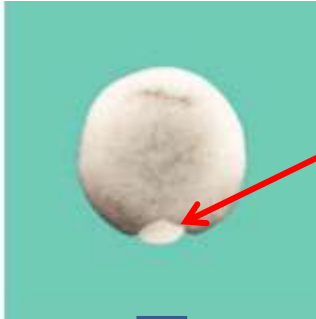


Document 2.
Expériences de Dale et Slack, (1987) :
mise en évidence
d'une régionalisation
de l'action
inductrices des
blastomères in vitro.

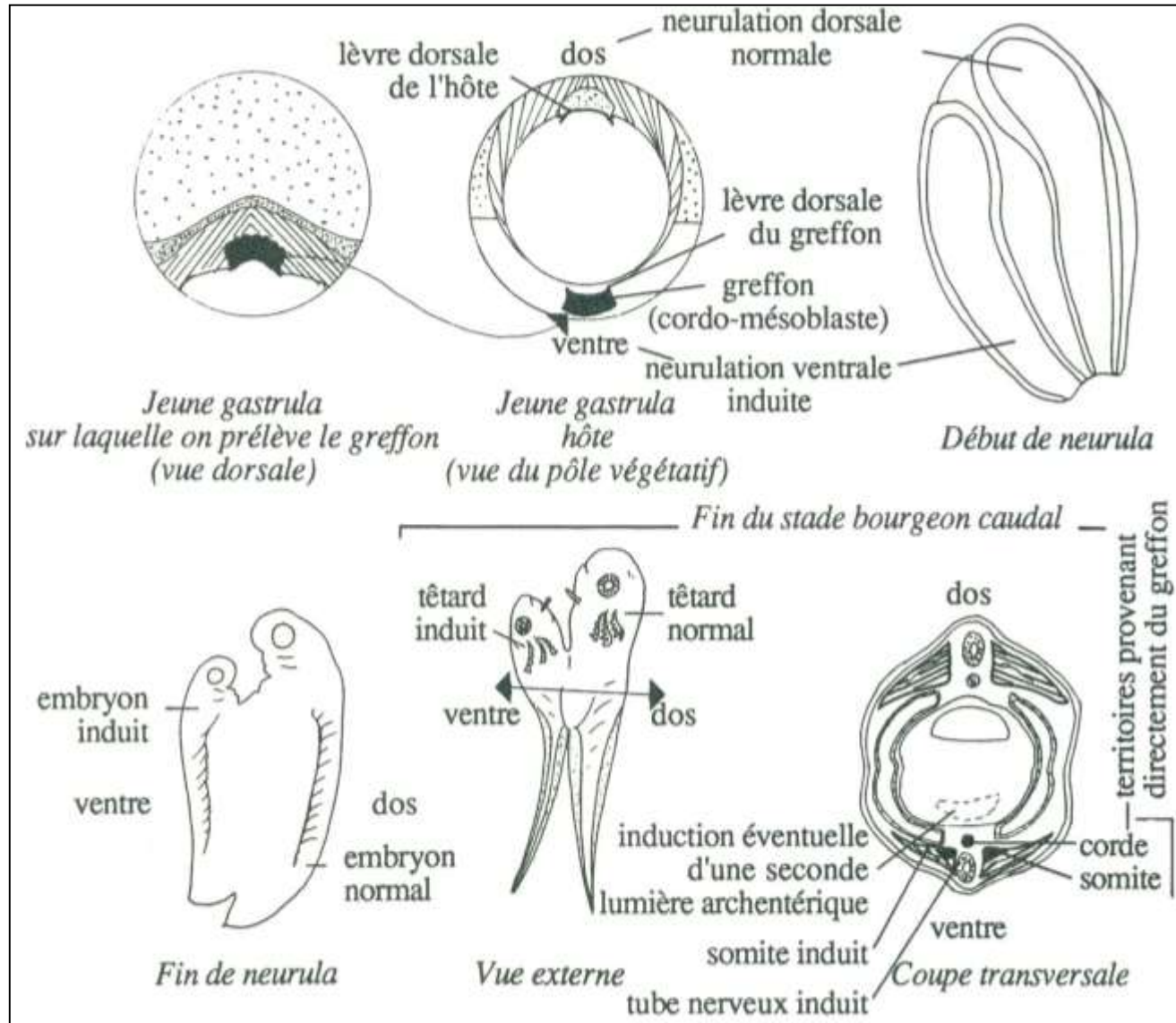
Recombinaisons effectuées entre les blastomères animaux de la rangée A avec un blastomère végétatif.

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

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



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology



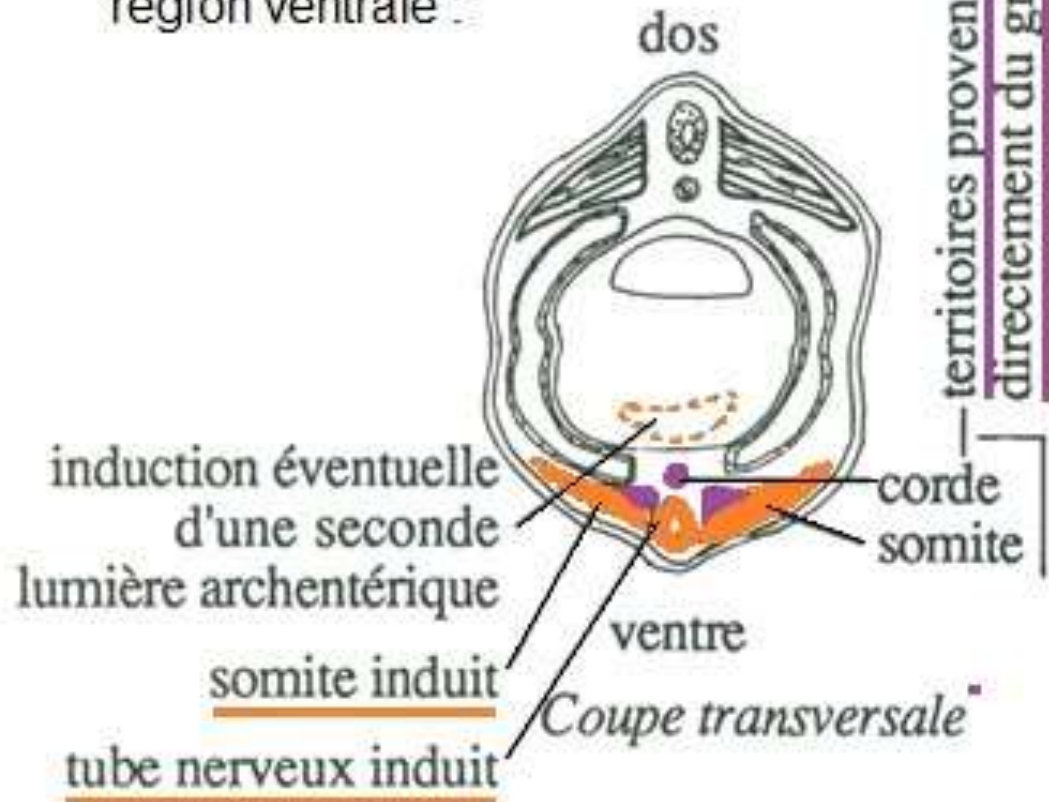
Document 3. Expérience de Spemann et Mangold : un autre exemple d'induction.

Observation de CT au stade bourgeon caudal tardif

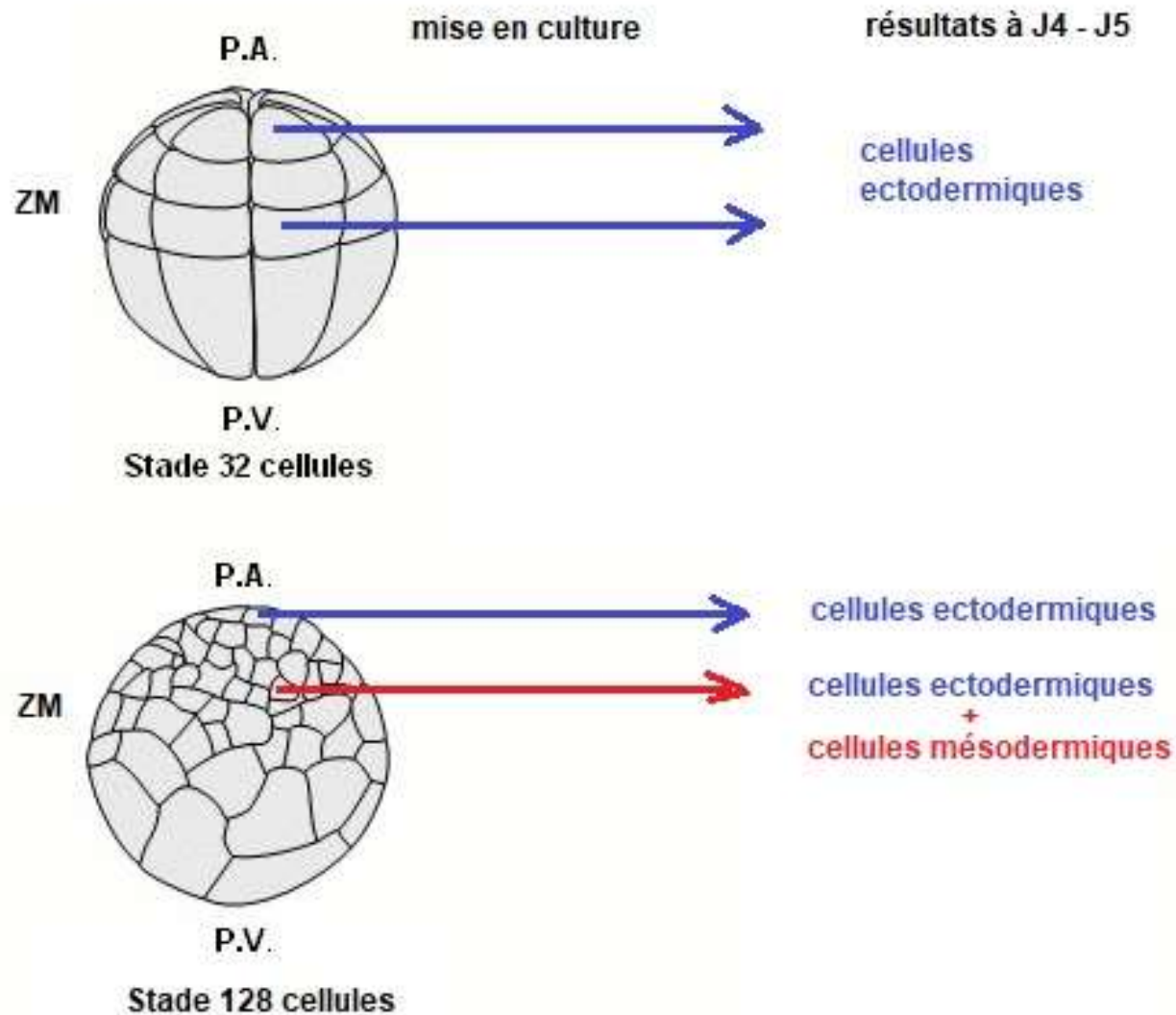
Résultat lors d'un développement embryonnaire normal :



Résultat observé à la suite de la greffe de la lèvre dorsale du blastopore en région ventrale :



Mise en évidence de l'acquisition d'une compétence des blastomères

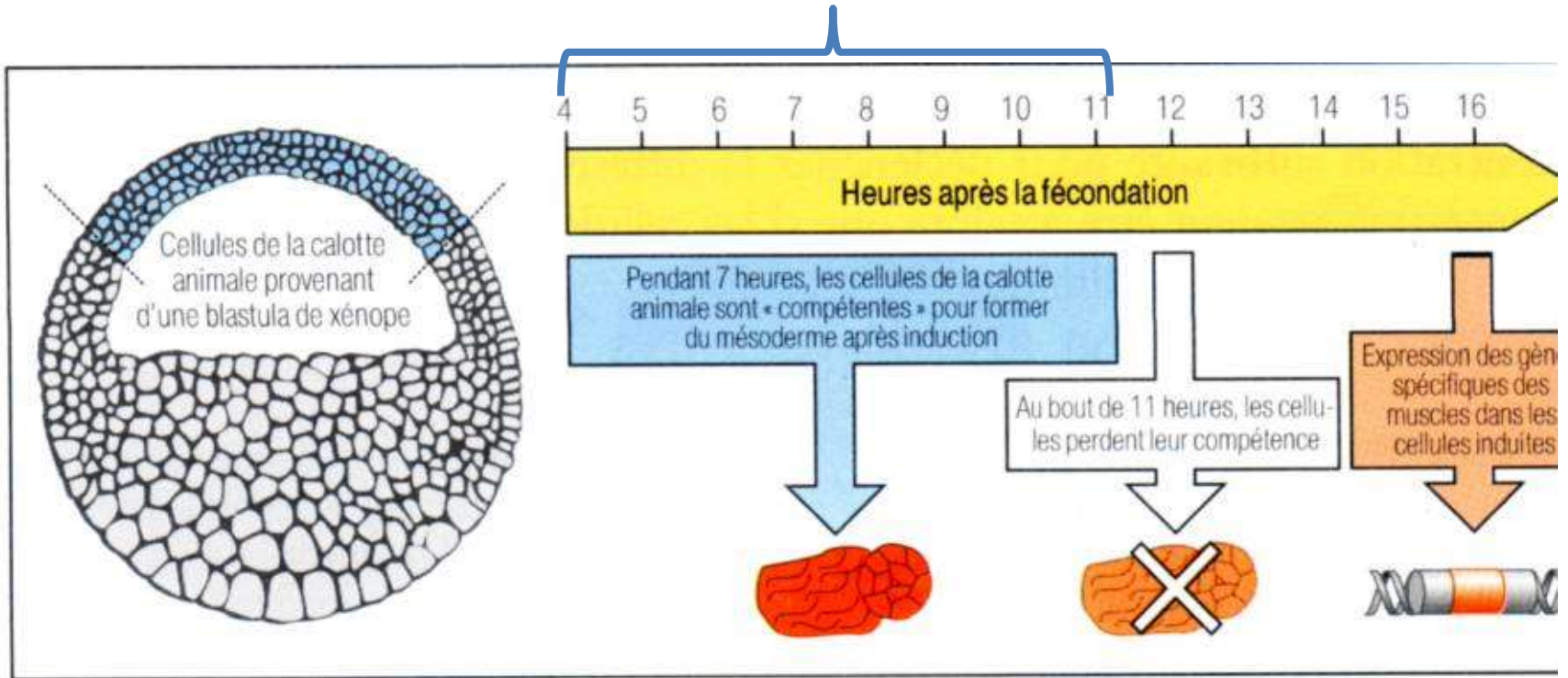


Document 4. Etude de la compétence des cellules lors de l'induction.

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

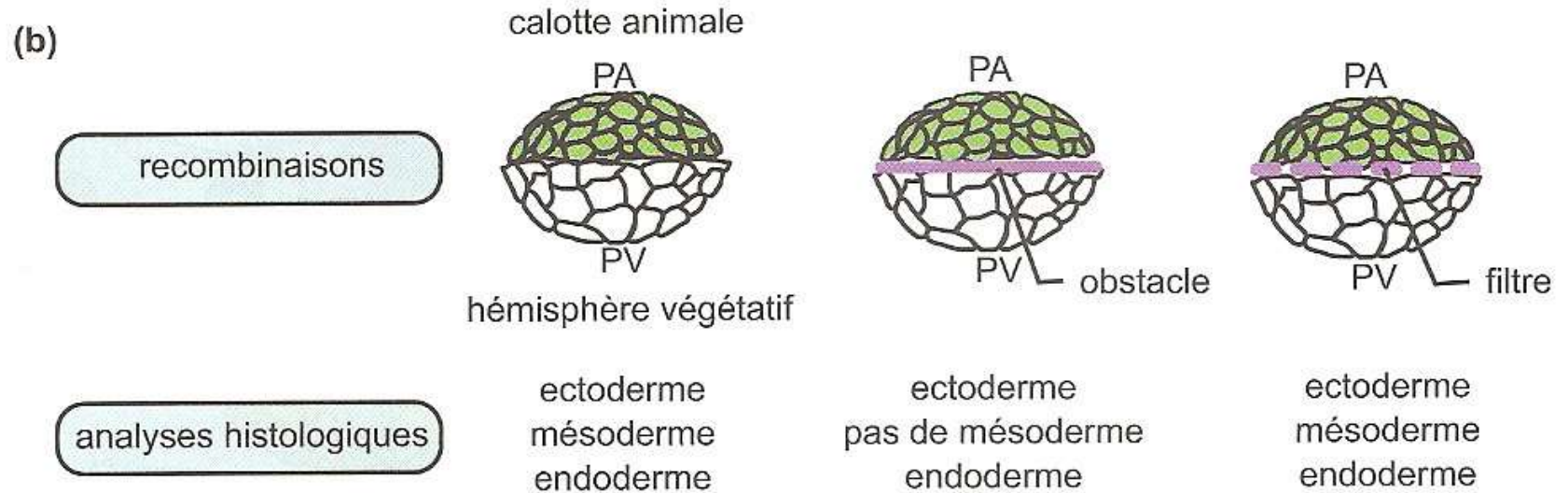
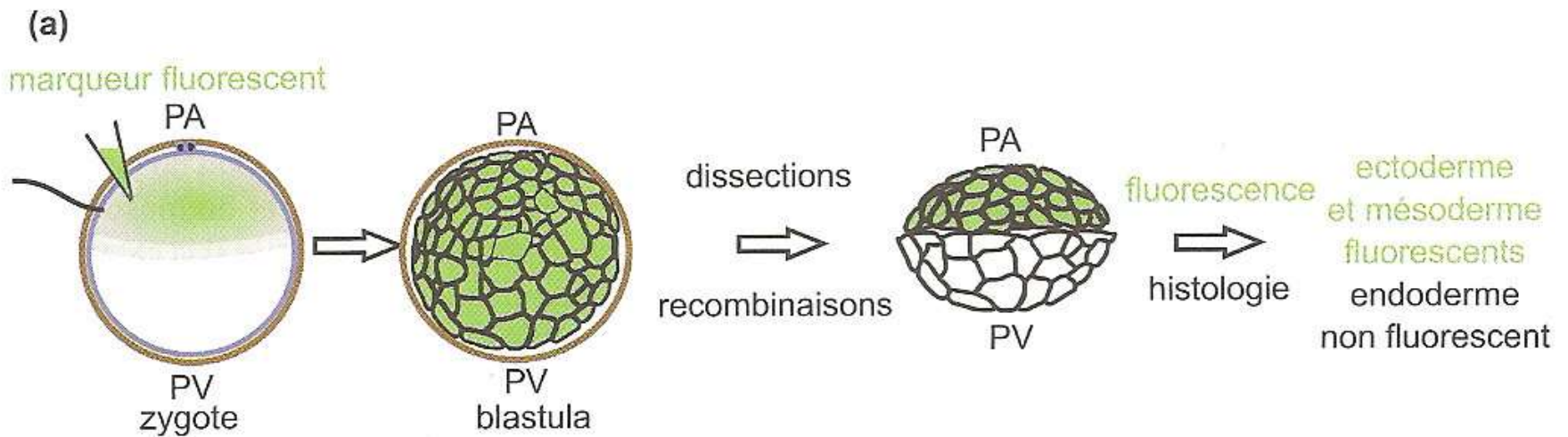
Document 5. La compétence des cellules, une fenêtre temporelle.

Stade 32 cellules → stade 128 cellules



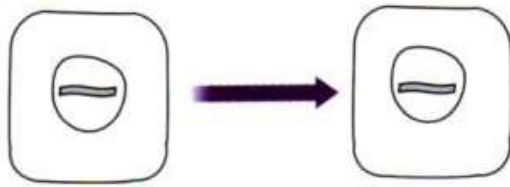
Quelques caractéristiques de l'induction :

- Les cellules sont compétentes pendant une fenêtre temporelle
→ **composante temporelle**
- Dépend d'un effet de groupe
→ **composante quantitative**
- L'induction du mésoderme est régionalisée (cf expériences de Dale et Slack)
→ **composante spatiale**

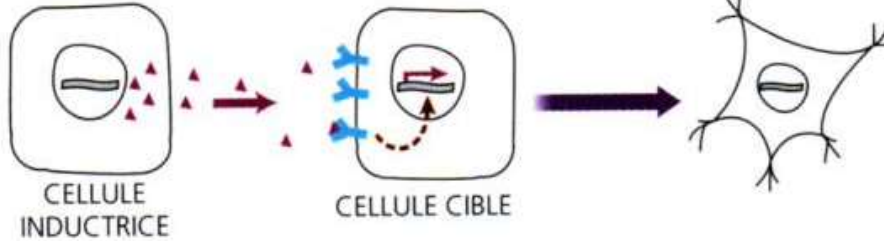


Document 6. Mise en évidence de l'intervention de substances inductrices.

a. en absence d'induction



b. induction

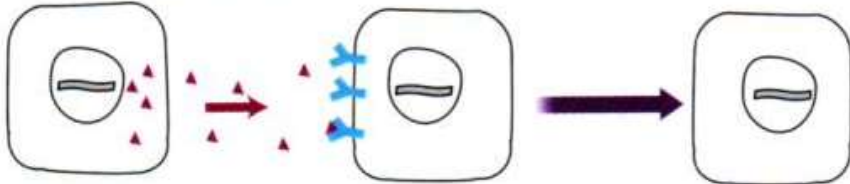


c. régulation de la compétence

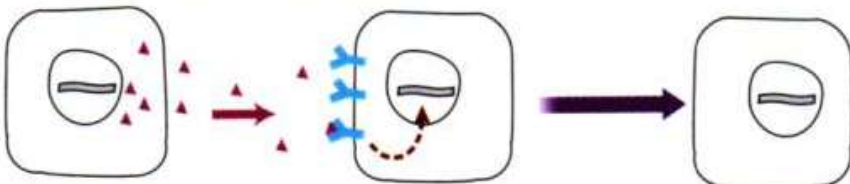
- pas de récepteur



- pas de transduction du signal



- pas d'activation de la transcription



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

→ Des récepteurs aux substances inductrices

→ Un mécanisme de transduction fonctionnel

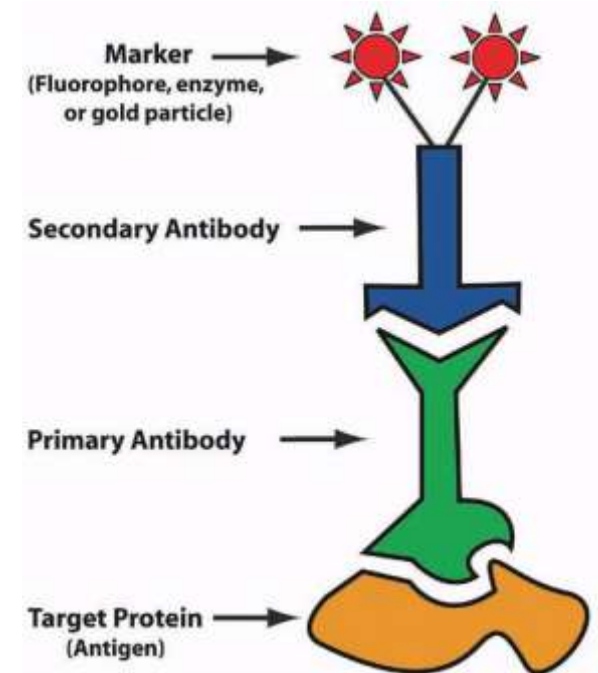
→ Le mécanisme de transduction doit activer des gènes cibles

Des méthodes pour identifier les molécules inductrices

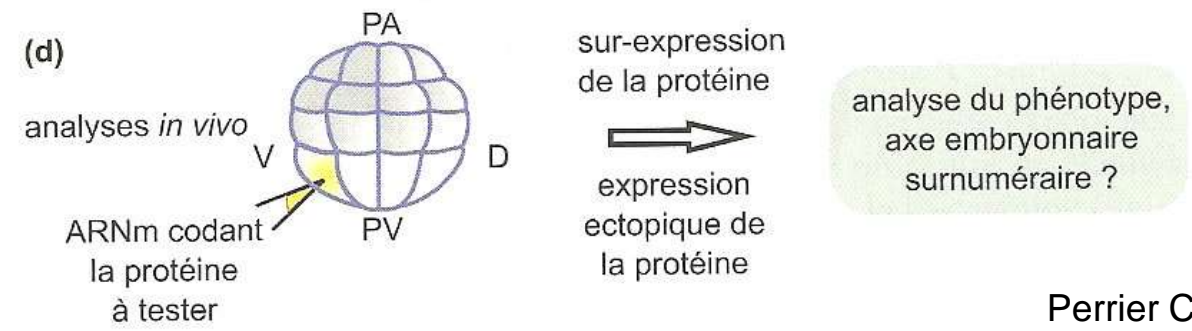
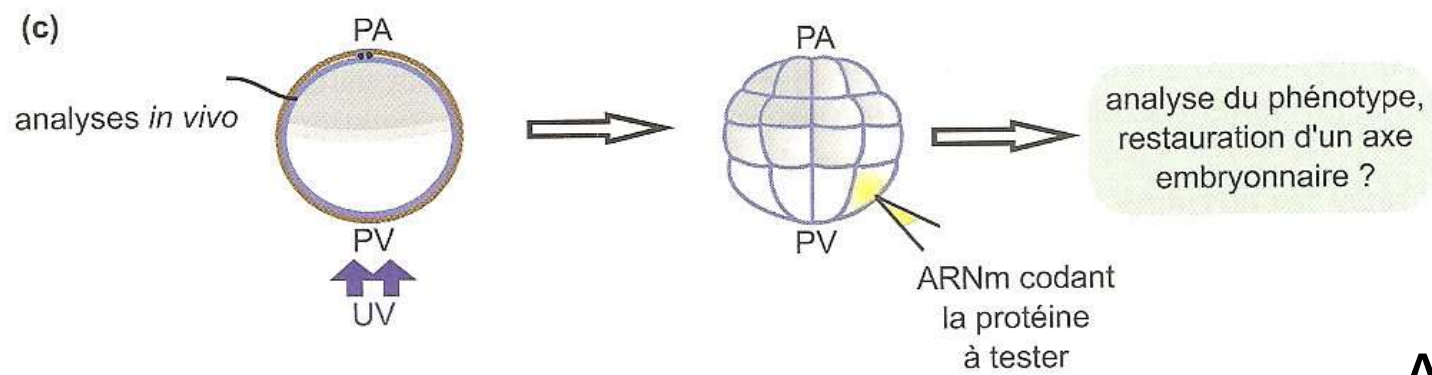
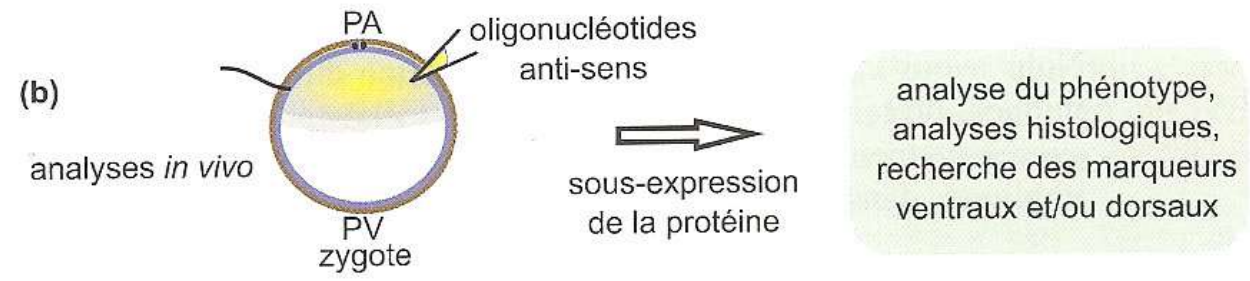
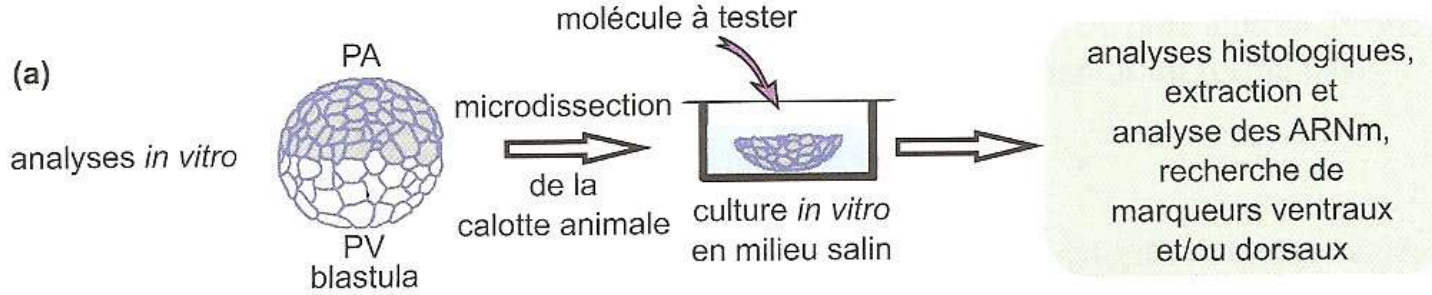
- Recherche de molécules présentes avant et après la transition mid-blastuléenne dans l'hémisphère végétatif

- Hypothèse : ce sont des protéines

→ recherche de la protéine elle-même : immunodétection

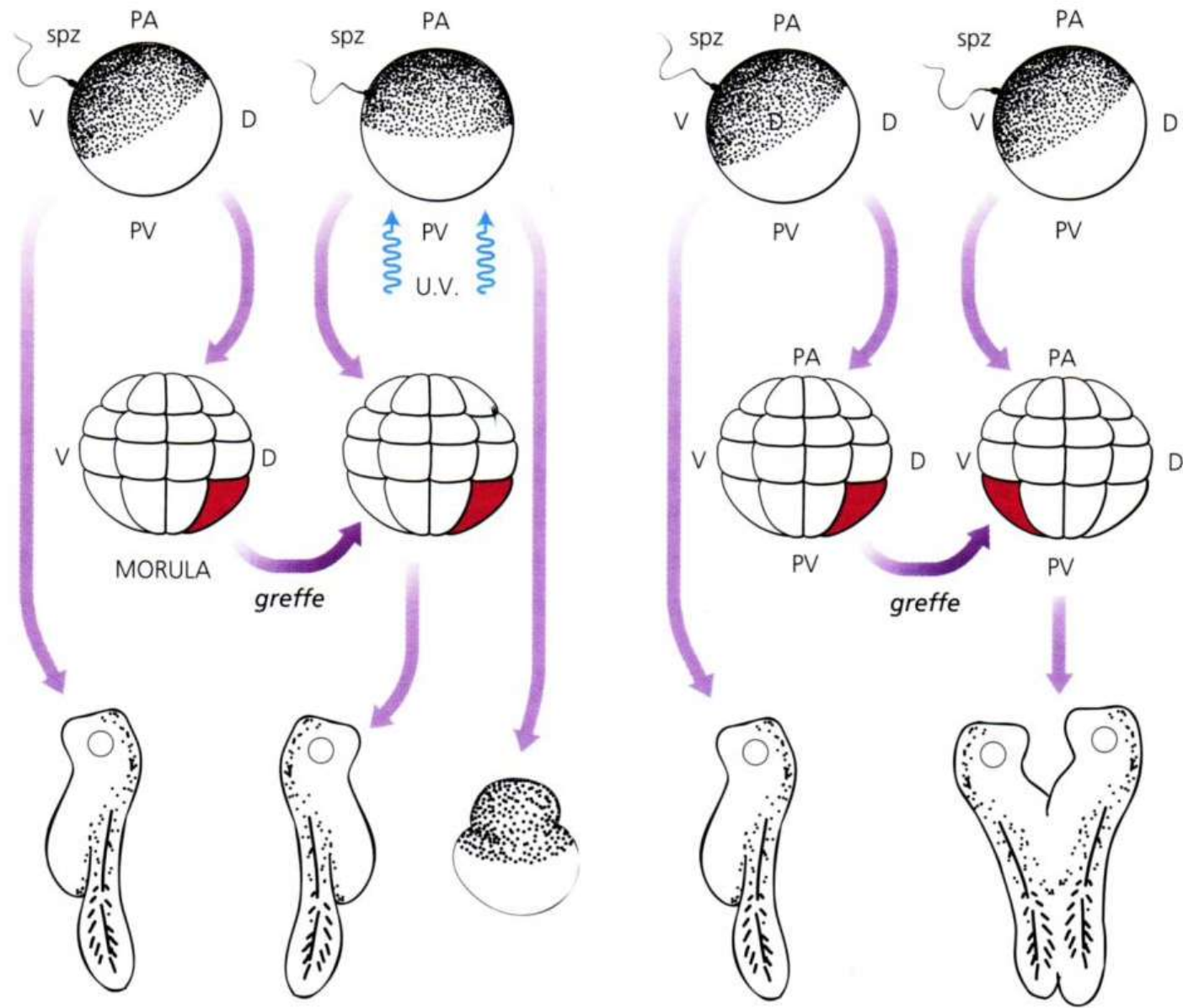


→ recherche de l'ARNm correspondant : hybridation moléculaire avec des sondes marquées



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

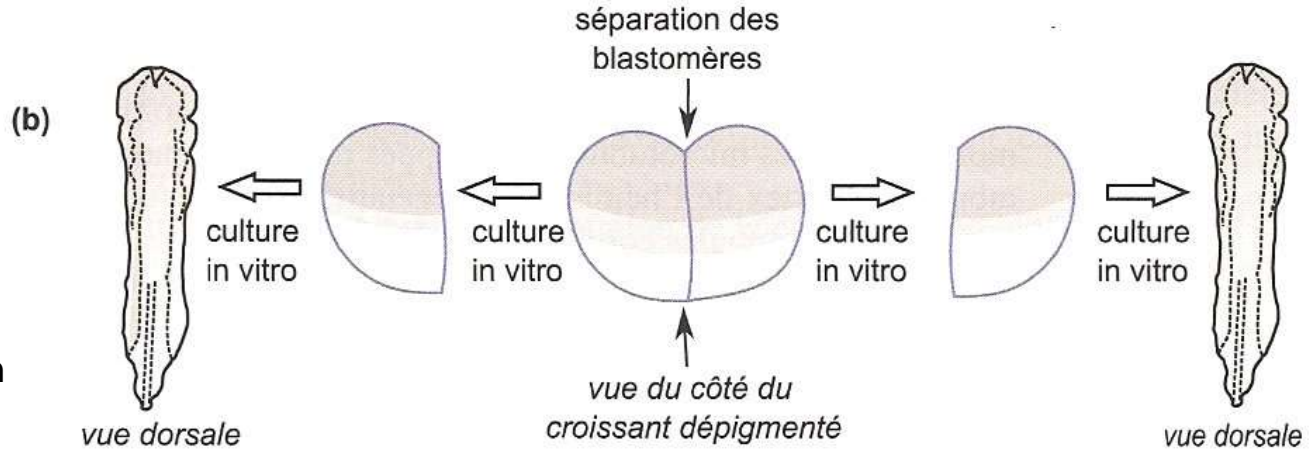
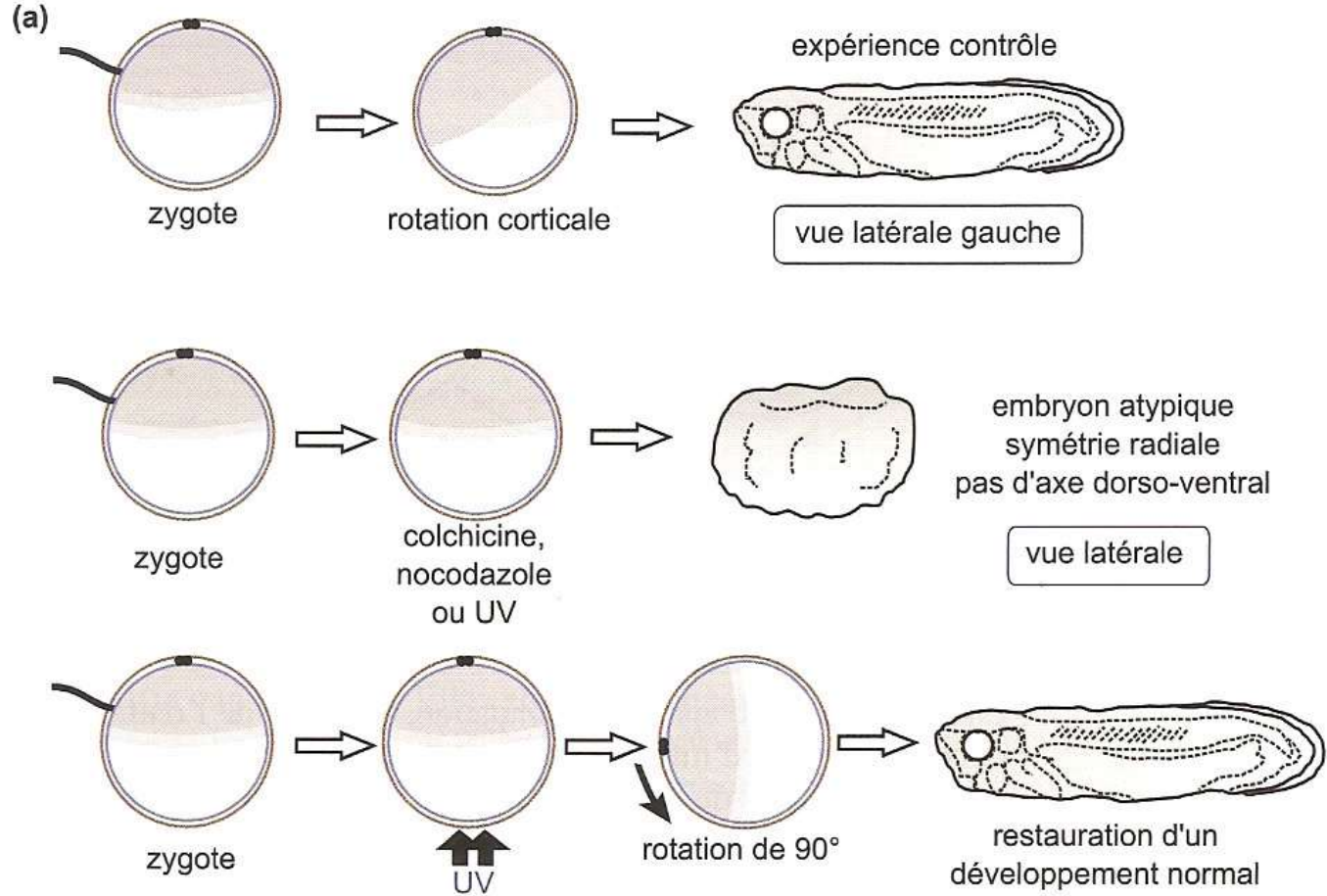
Embryon atypique ventralisé.
 Pas d'axe dorso-ventral
 Symétrie radiale.

Témoin

Formation d'un axe embryonnaire surnuméraire.

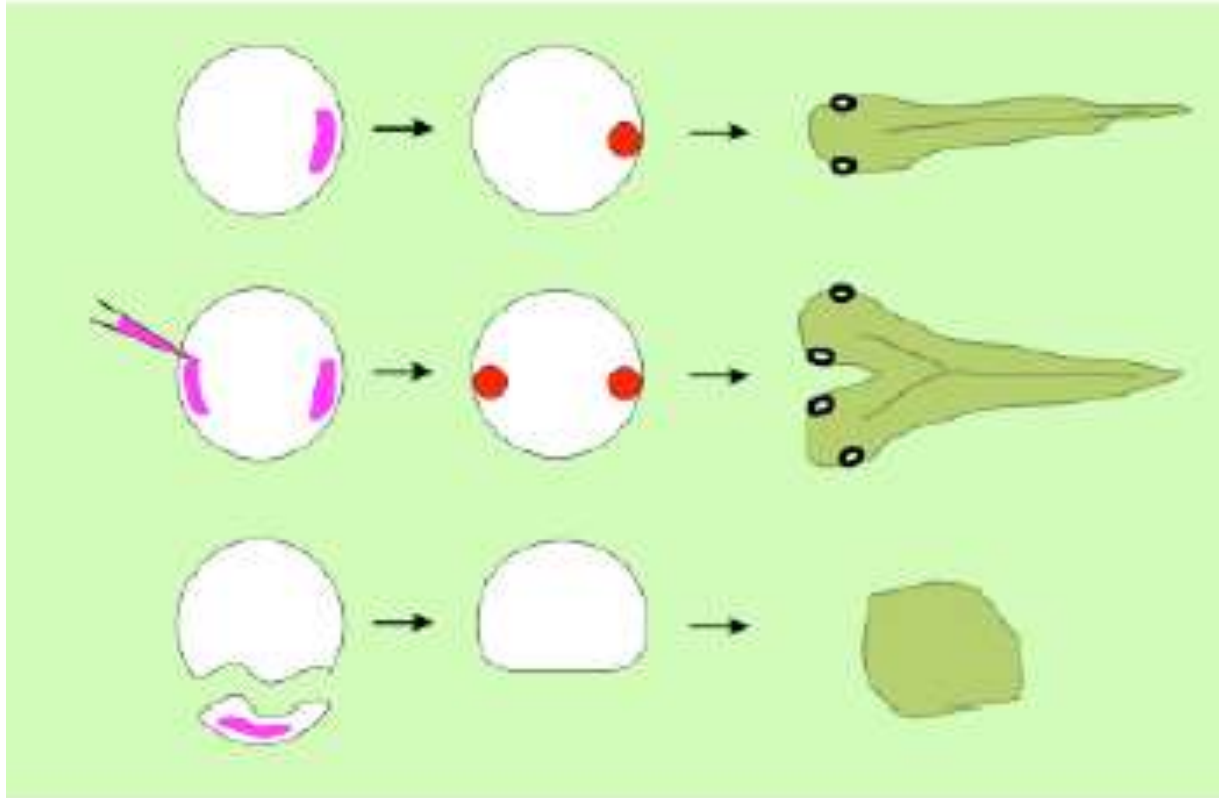
Document 10.

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

A la recherche de signaux inducteurs...

→ Certaines protéines maternelles injectées dans un embryon irradié se comportent comme un Centre de Nieuwkoop,

par exemple :

Vg1

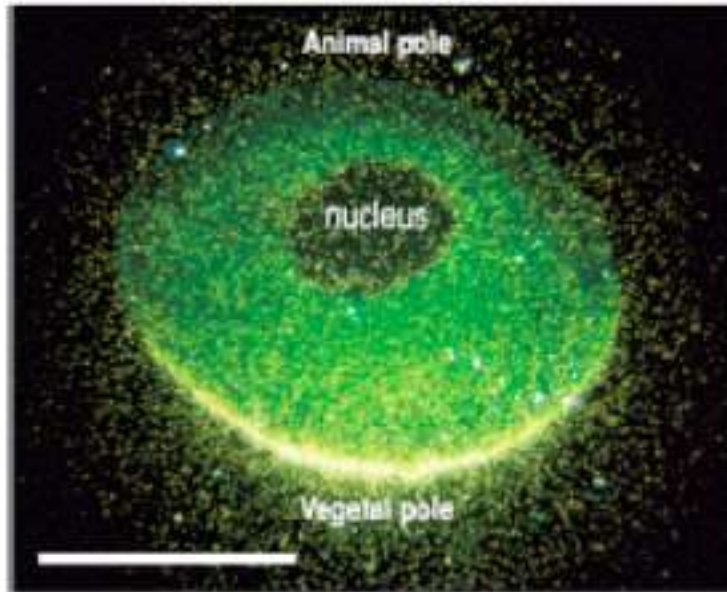
**Un facteur de
croissance**

β – caténine

**Un facteur de
transcription**

→ **Des modes d'action différents**

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

Les ARNm codant Vg1 sont redistribués lors de la rotation corticale

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.

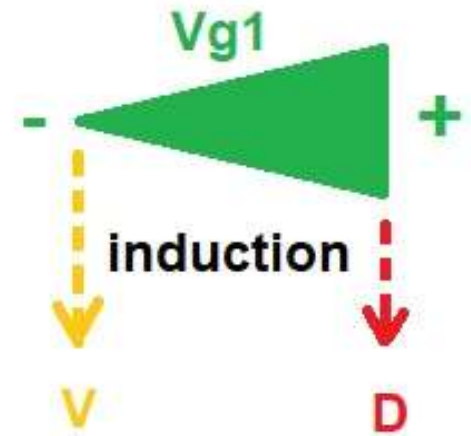
Vg1, facteur de croissance

Facteurs de croissance :

- Peptides inducteurs agissant sur des cellules proches en se liant à un récepteur membranaire
 - Activent ou répriment l'expression de gènes cibles
- Vg1 se comporte comme un CN
- ARNm codant Vg1 localisés dans le cortex végétatif de l'ovocyte redistribués lors de la rotation corticale
- Injection d'ARNm codant des Vg1 mutées incapables de se lier à leur récepteur
→ embryons dépourvus de structures dorsales
- Action inductrice de mésoderme qui dépend de sa concentration :

Vg1 est impliquée dans l'activité inductrice du centre de Nieuwkoop :

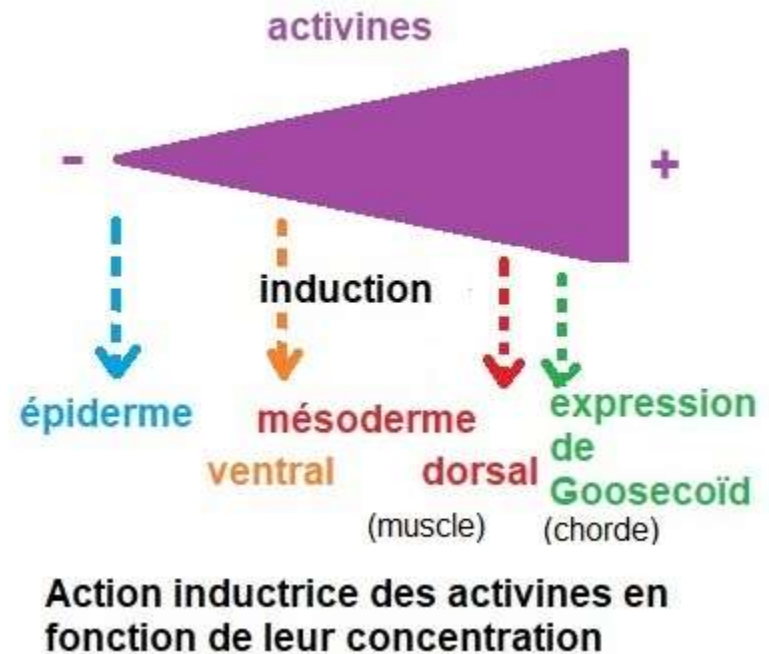
- A forte dose : signal végétatif dorsalisant,
 - A faible dose : signal végétatif ventralisant.
- Probablement l'un des 1ers déterminants inducteur de la zone marginale dorsale**



Action inductrice de Vg1 en fonction de sa concentration

Les activines, facteurs de croissance

- Activines + blastomères de la calotte animale → induction de cellules de chorde et de cellules musculaires (qui dérivent de mésoderme dorsal)
- Présentes dans les blastomères végétatifs après la transition mid-blastuléenne
- Action inductrice qui dépend de leur concentration :
- Contrôle l'expression de Goosecoïd, gène codant pour un facteur de transcription impliqué dans la structuration dorso-ventrale du mésoderme



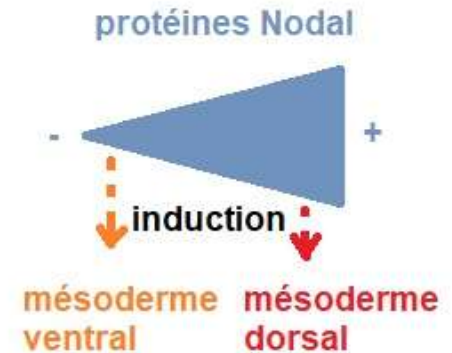
Les activines sont impliquées dans l'activité inductrice du centre de Nieuwkoop :

- Induction de mésoderme ventral ou dorsal selon leur concentration,
- Induisent à forte dose l'expression de Goosecoïd, gène du centre organisateur de Spemann

Autres facteurs de croissance inducteurs de mésoderme

- **Les protéines Nodal :**

- Présentes dans les blastomères végétatifs : d'abord dans les blastomères dorso-végétatifs puis dans les blastomères ventraux-végétatifs
- Exprimées à forte dose et longtemps dans le centre de Nieuwkoop / à moindre dose et moins longtemps dans la région ventrale
→ **gradient temporel et spatial**
- Action inductrice qui dépend de leur concentration :



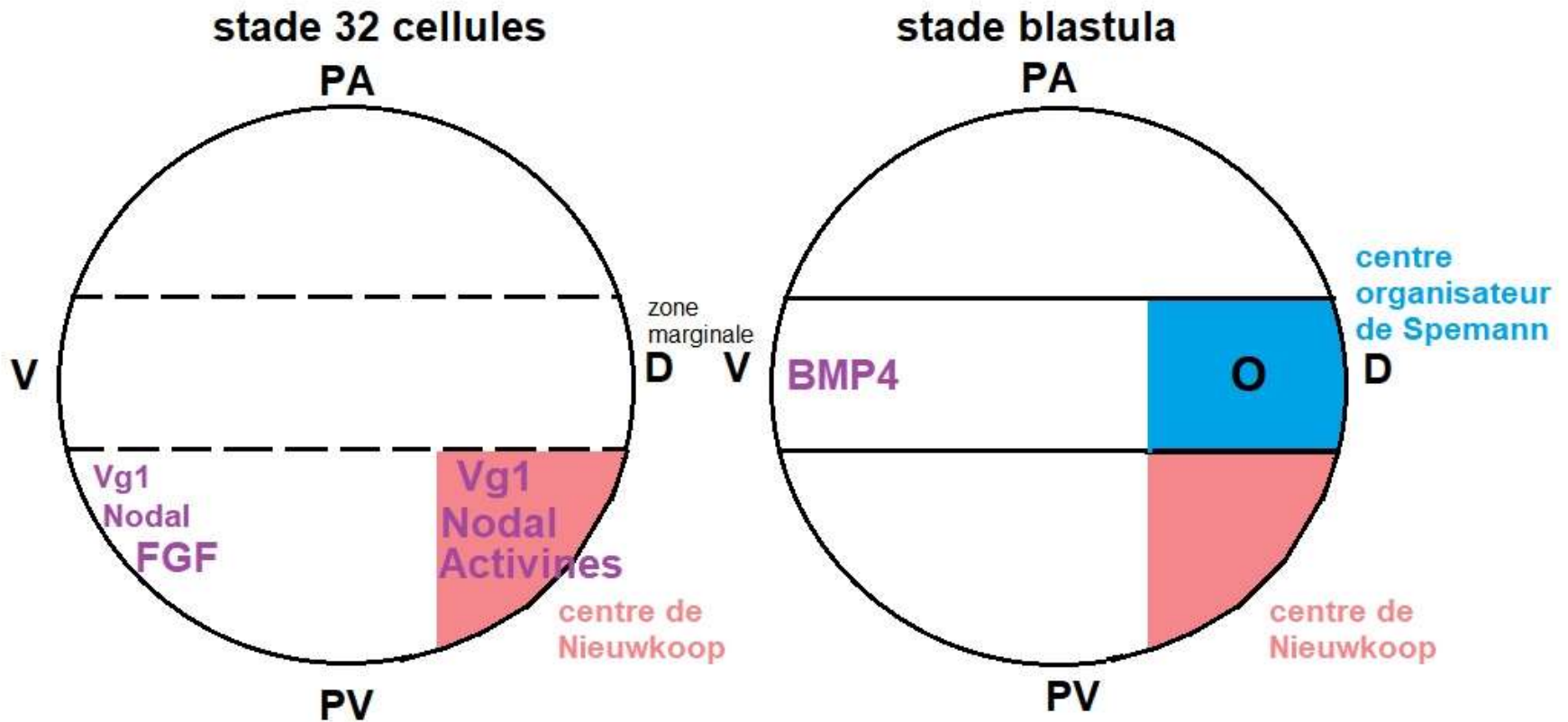
Action inductrice des protéines Nodal en fonction de leur concentration

- **BMP4 :**

- Présents dans les blastomères de la blastula, absents du centre de Spemann lors de la gastrulation
- Action inductrice de mésoderme latéral et ventral

- **Les FGF :**

- Présents dans les blastomères végétatifs, certains hérités de l'ovocyte d'autres synthétisés après la transition mid-blastuléenne
- Action inductrice de mésoderme latéral et ventral

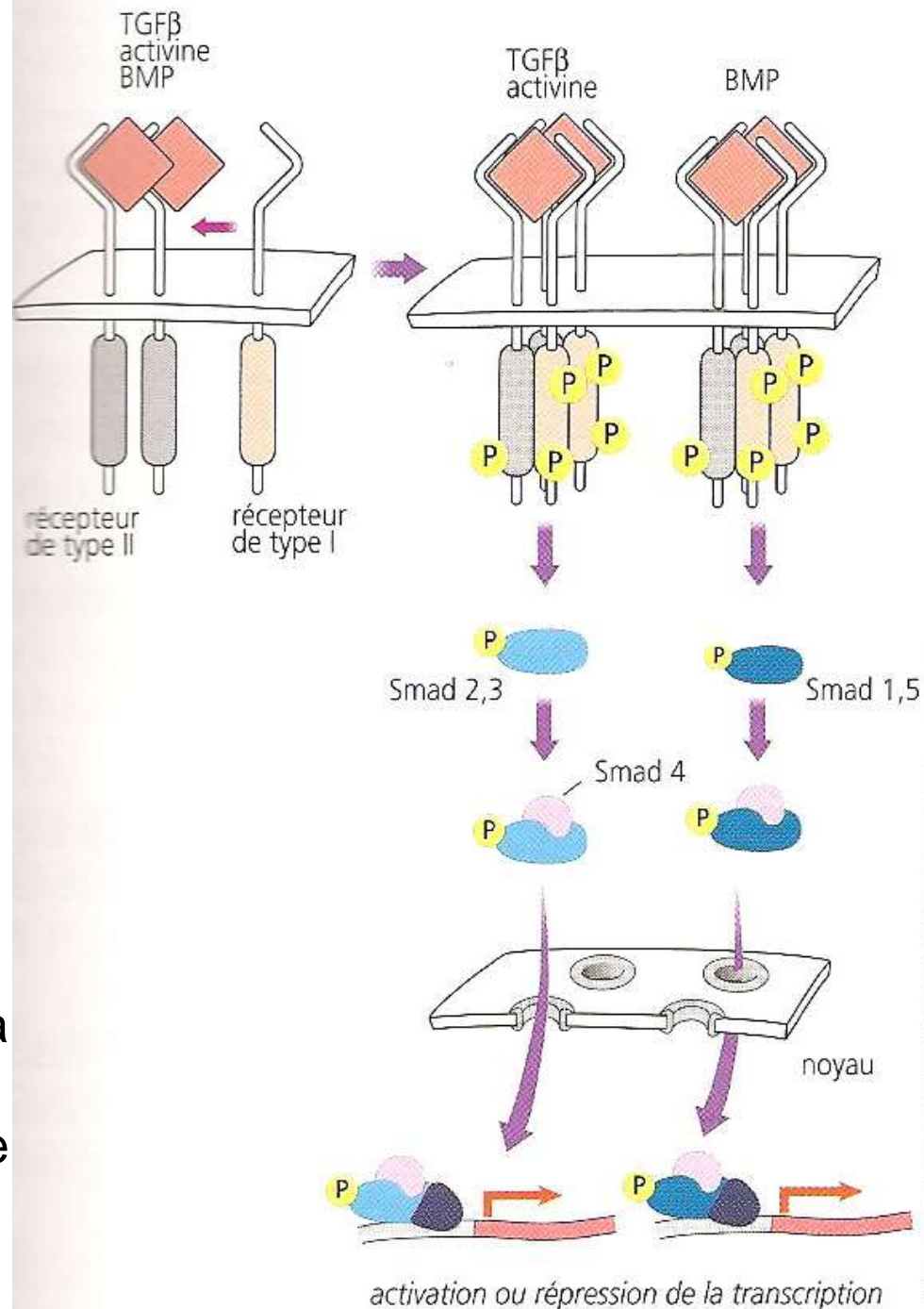


Récapitulatif de la localisation des facteurs de croissance étudiés

Mode d'action des facteurs de croissance de la famille des TGF : Vg1, activines, Nodal, 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 facteurs de transcription impliqués dans l'induction du mésoderme

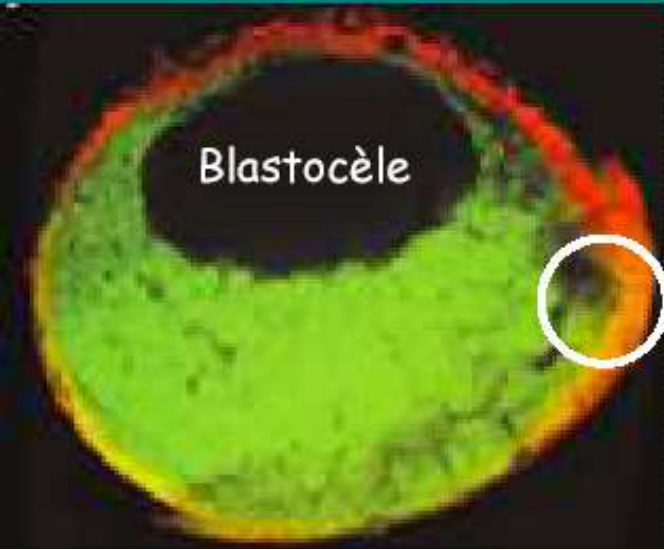
- **Veg T :**

- ARNm localisé dans l'hémisphère végétatif de l'ovocyte, puis dans les blastomères végétatifs
- Expression ARNm codant VegT empêchée → pas de dérivés endodermiques

Veg T est un déterminant cytoplasmique de l'endoderme

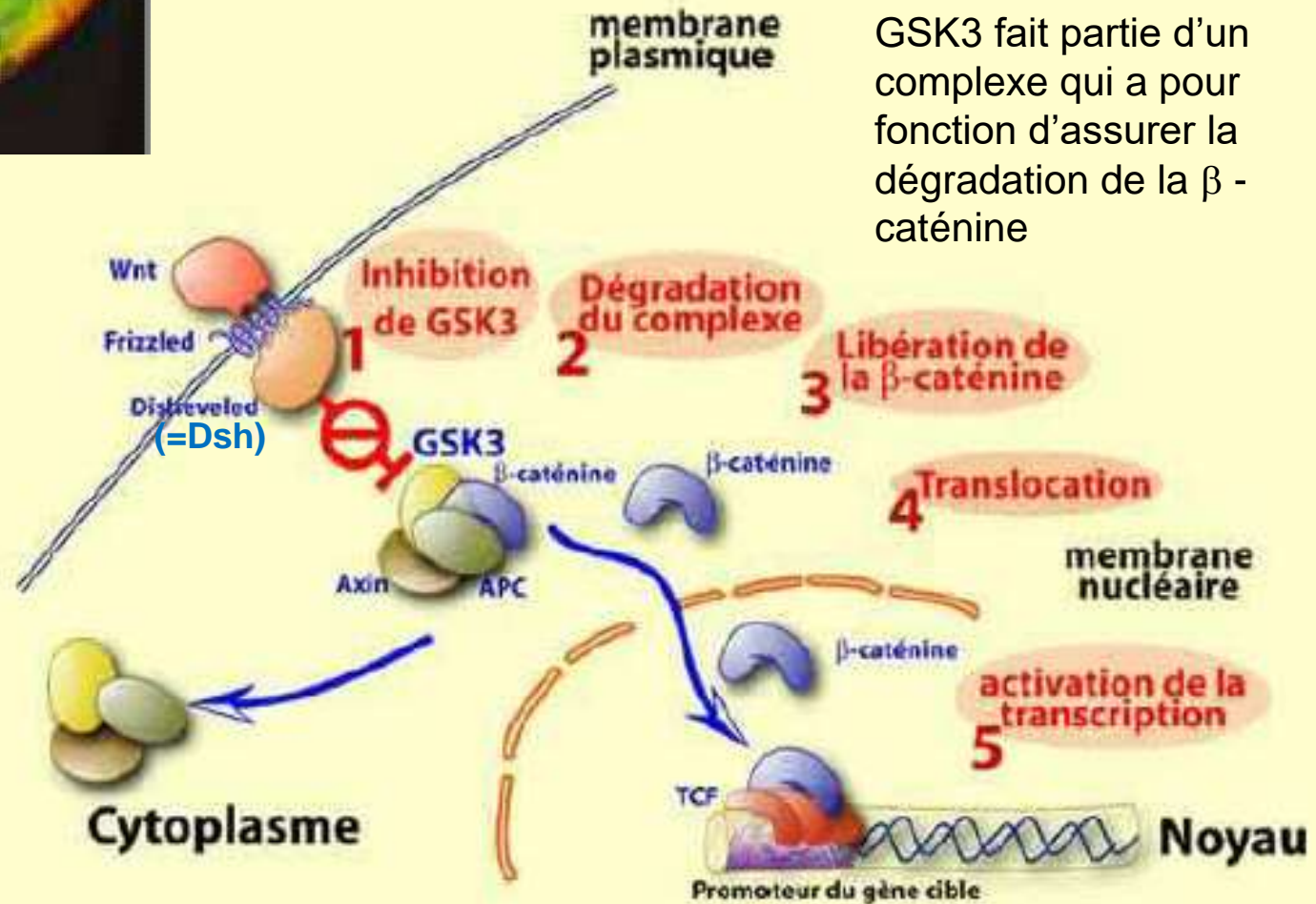
- **β - caténine :**

- Cytoplasmique au stade 2 cellules / dans les noyaux des blastomères dorsaux puis seulement dans ceux du centre de Nieuwkoop



Localisation de la β - caténine
au début de la gastrulation :
dans le centre de Nieuwkoop

GSK3 fait partie d'un
complexe qui a pour
fonction d'assurer la
dégradation de la β -
caténine



La β - caténine, facteur de transcription

Dsh est séquestrée dans
des vésicules du cortex
de l'hémisphère végétatif,
transférées dans la
région dorsale lors de la
rotation de symétrisation,
où elles libéreront leur
contenu

Crédit photographique:

Christophe Magnan
Professeur Université Paris 7

Des facteurs de transcription impliqués dans l'induction du mésoderme

- **Veg T :**

- ARNm localisé dans l'hémisphère végétatif de l'ovocyte, puis dans les blastomères végétatifs
- Expression ARNm codant VegT empêchée → pas de dérivés endodermiques

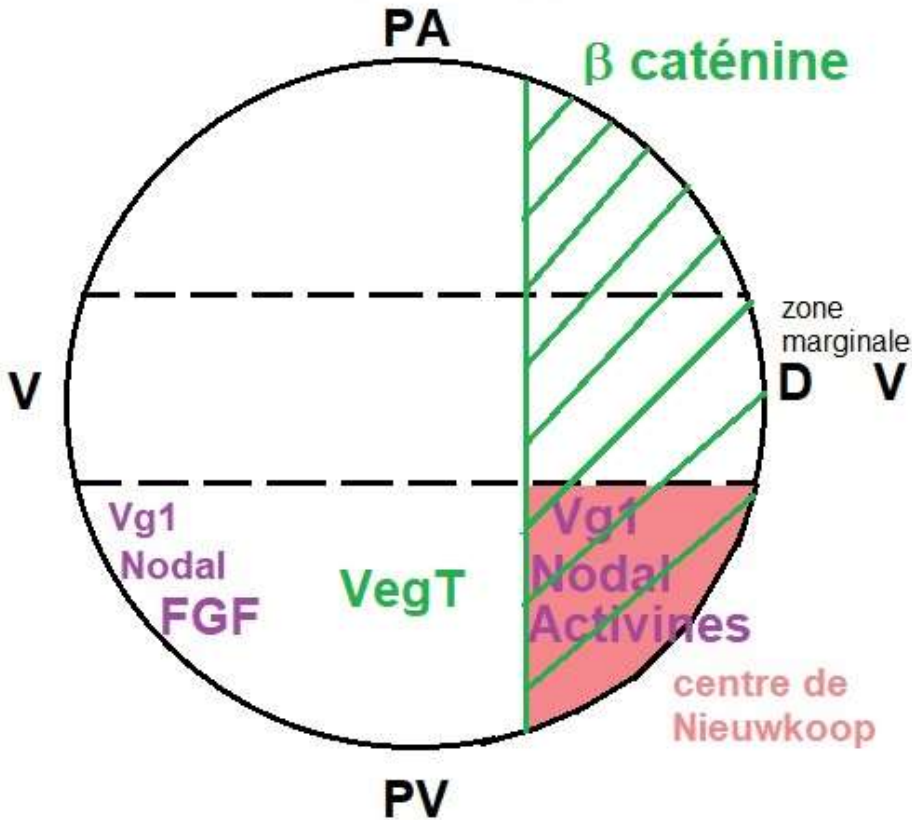
Veg T est un déterminant cytoplasmique de l'endoderme

- **β - caténine :**

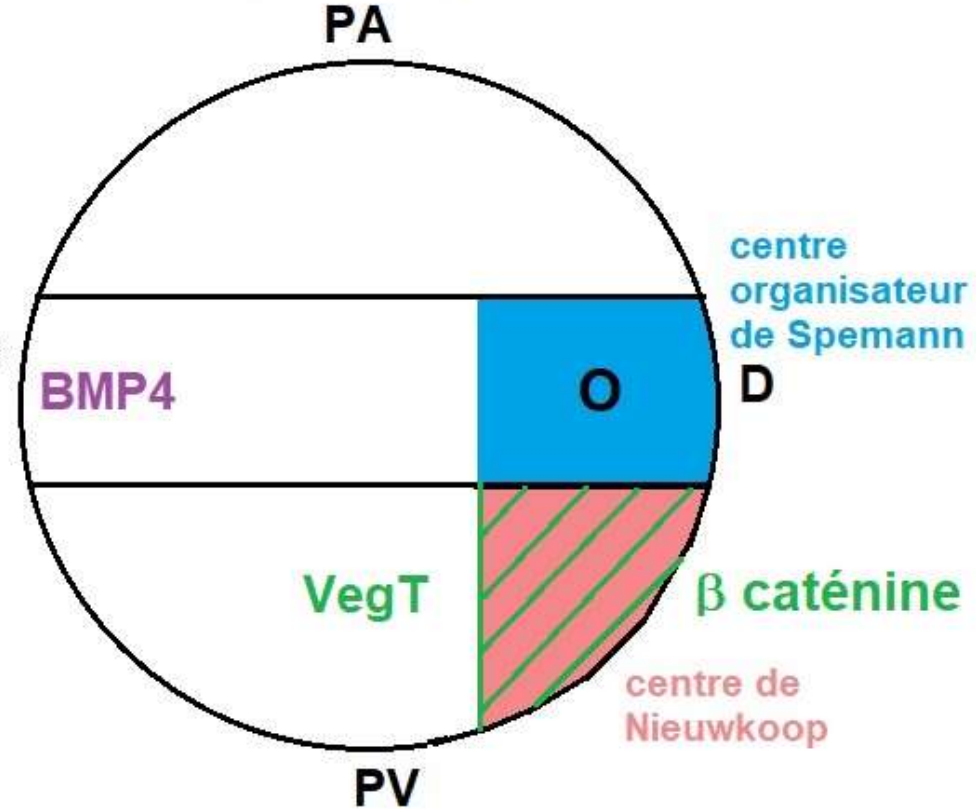
- Cytoplasmique au stade 2 cellules / dans les noyaux des blastomères dorsaux puis seulement dans ceux du centre de Nieuwkoop
- Déplétion de l'ARNm → pas de structures dorsales dans l'embryon

La β - caténine est un déterminant cytoplasmique dorsalisant : elle induit l'expression de gènes indispensables au fonctionnement du Centre de Nieuwkoop (ex : Siamois)

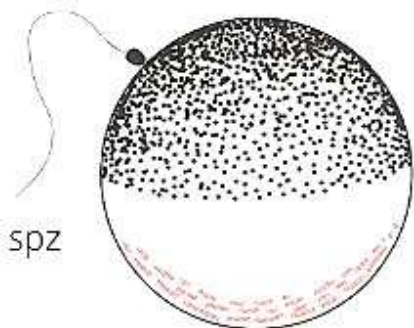
stade 32 cellules



stade blastula



Récapitulatif de la localisation des facteurs de croissance (en violet) et facteurs de transcription (en vert) étudiés

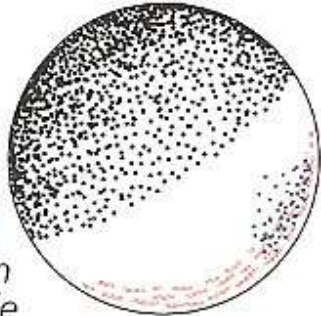


Des ARNm (Vg1 et Veg T) et des protéines (Dsh) sont concentrés dans le cortex de l'hémisphère végétatif.

PV

fécondation

PA

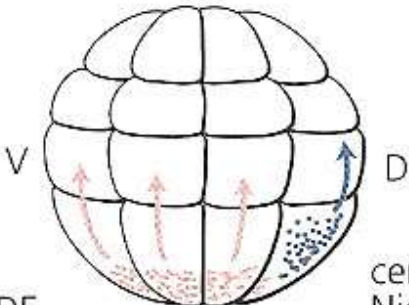


La rotation corticale déplace et active les ARNm et les protéines dans la région dorso-végétative.

PV

PA

segmentation



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

STADE
32 CELLULES

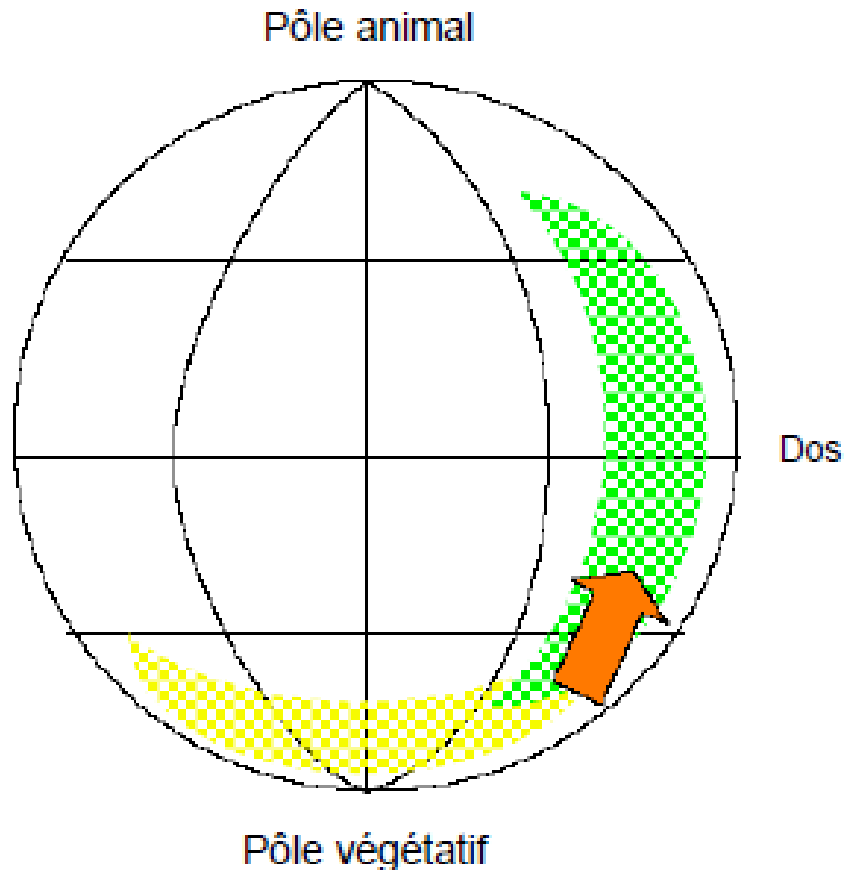
PV

Document 12. Modèle des interactions moléculaires induisant le mésoderme.

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

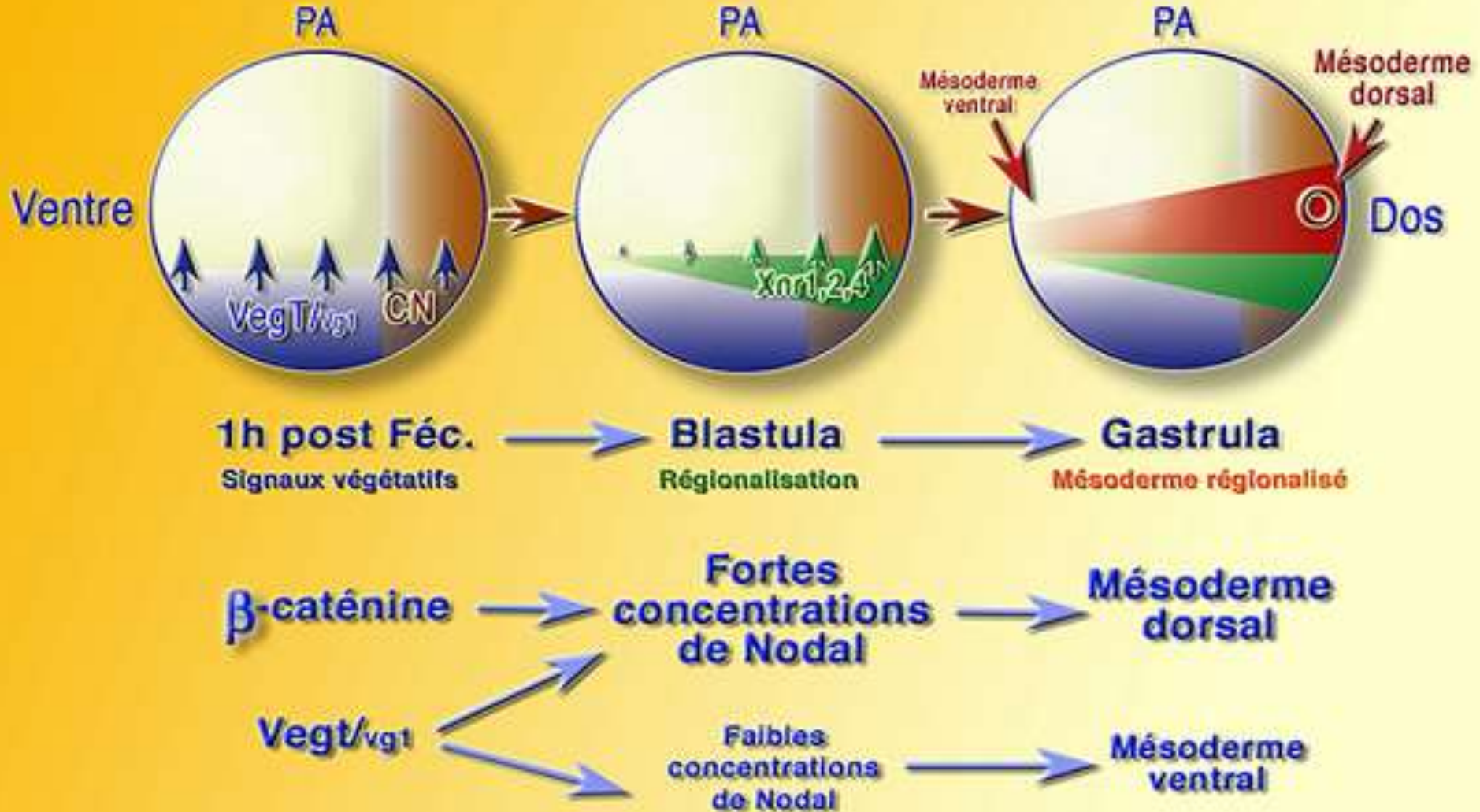
T. Darribère, Introduction à la biologie du développement, Ed. Belin 2002.

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



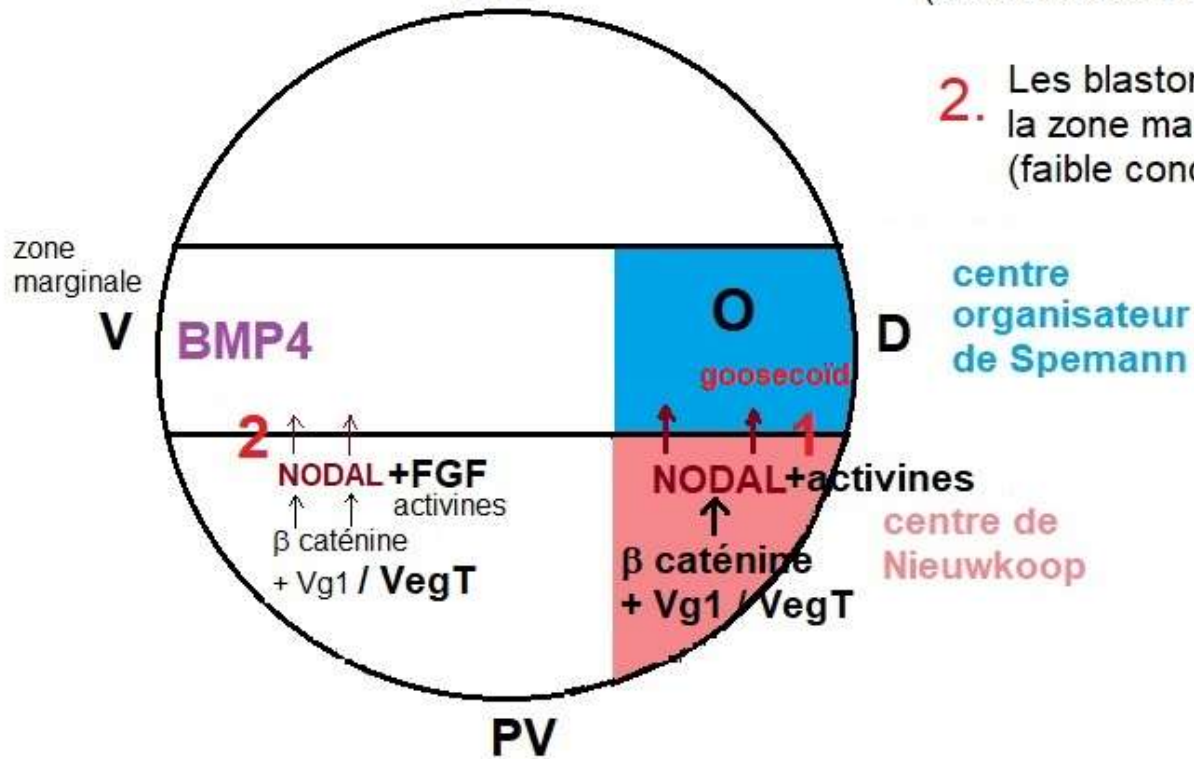
- L'action conjuguée d'un déterminant dorsal, la β -caténine et d'un déterminant végétatif (Vg 1 ou Veg T) active l'expression des Xnrs (Xenopus nodal-related, famille des TGFB) uniquement dans la région dorsale de l'embryon
- Les protéines Xnrs activent des gènes qui s'expriment uniquement dans les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

Modèle de l'induction mésodermique



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

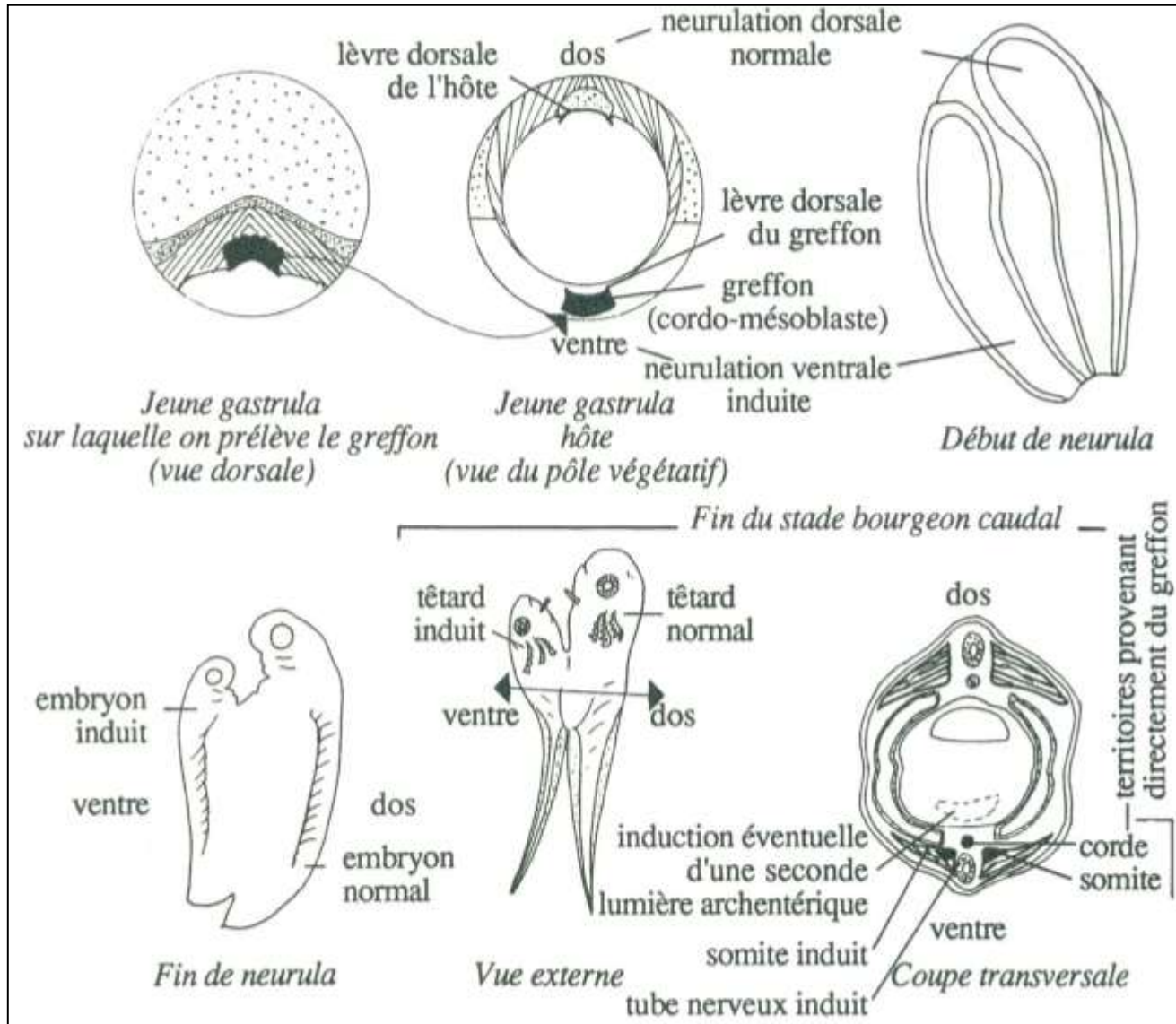
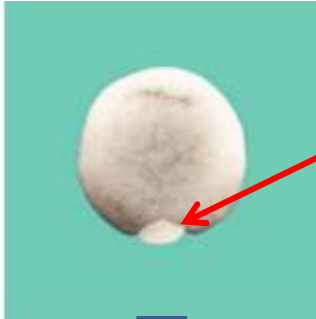
stade blastula
PA



1. Le CN induit le centre organisateur de Spemann (concentration élevée de NODAL)
2. Les blastomères ventro-végétatifs induisent la zone marginale en mésoderme (faible concentration de NODAL)

Cascade d'inductions conduisant à la détermination de la zone marginale

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

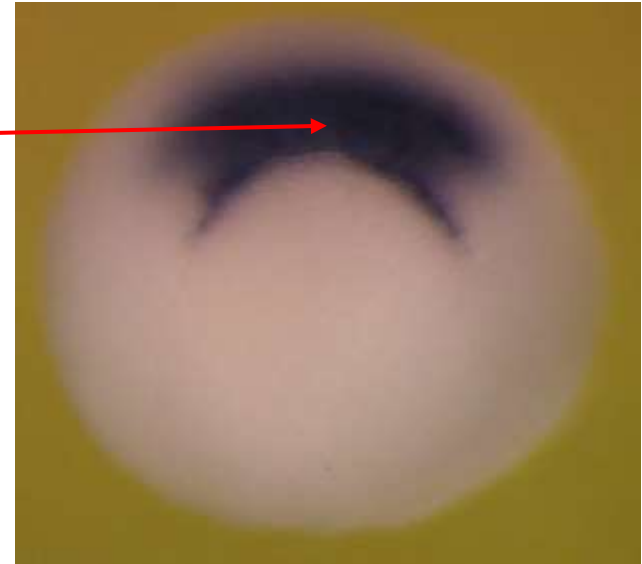


Domaines d'expression de goosecoïd et chordin en début de gastrulation



goosecoïd

lèvre dorsale du
blastopore (correspond
au centre de Spemann)



chordin

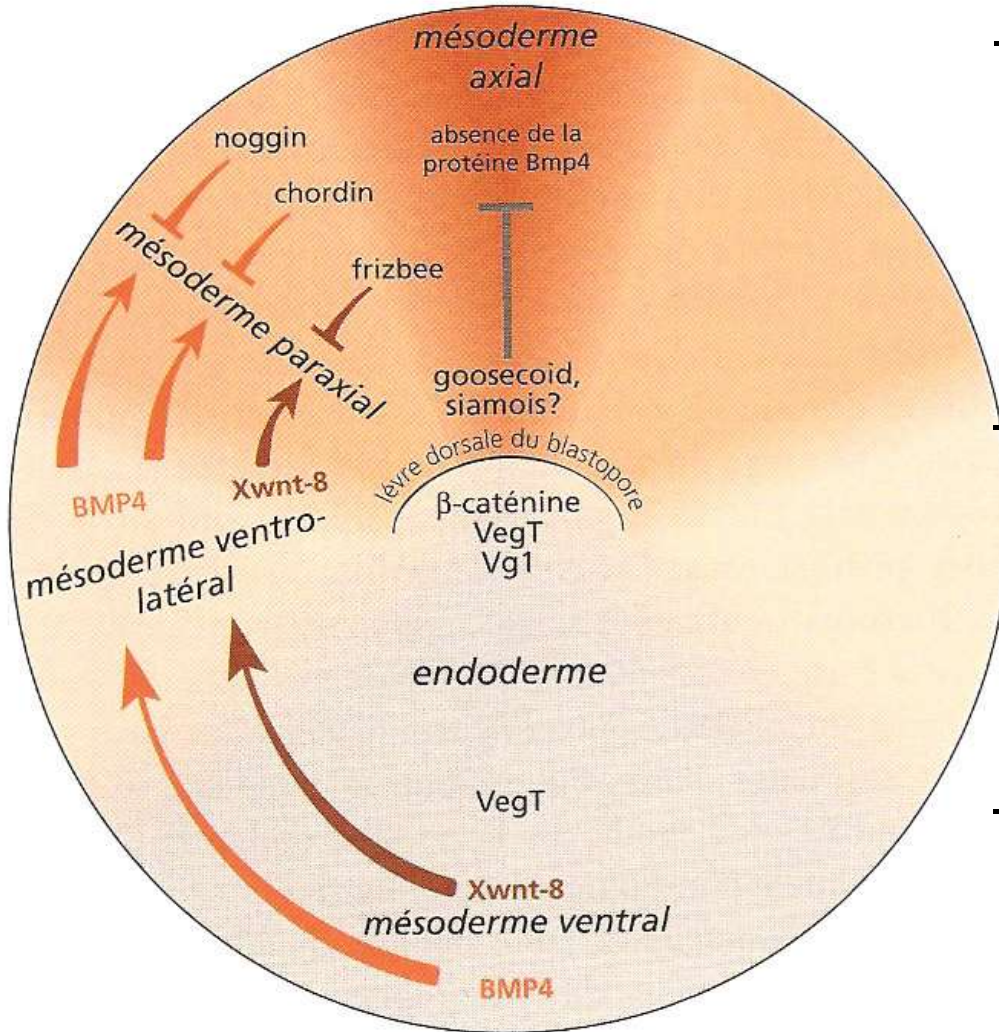
*Rappel : Des concentrations élevées d'activine permettent l'expression de Goosecoïd, qui code pour un **facteur de transcription***

Chordin, protéine sécrétée, diffuse à partir du domaine d'expression et agit dans l'espace intercellulaire : c'est un **facteur de croissance**

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.

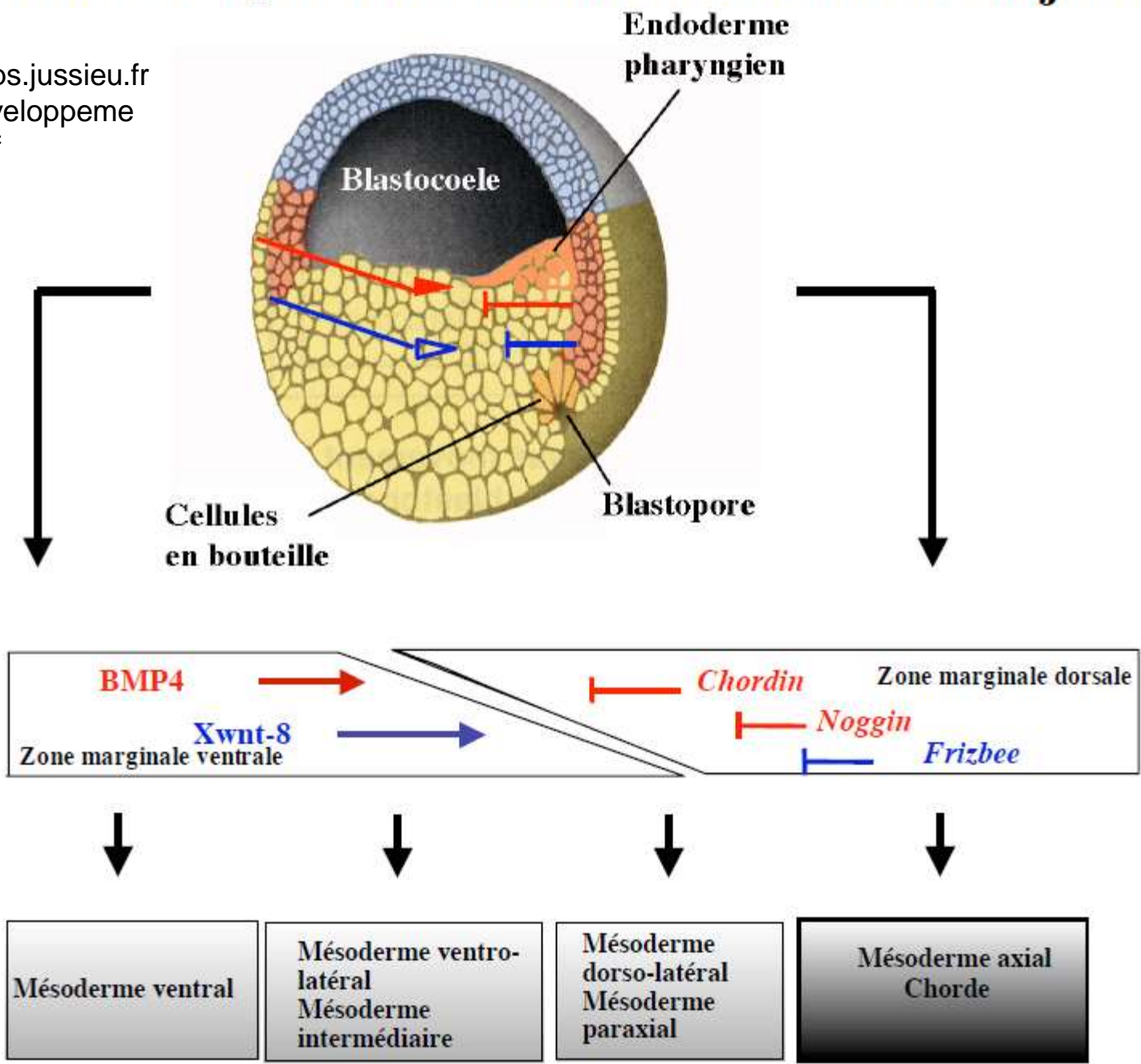
Rôle du centre de Spemann dans l'induction du mésoderme



- 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

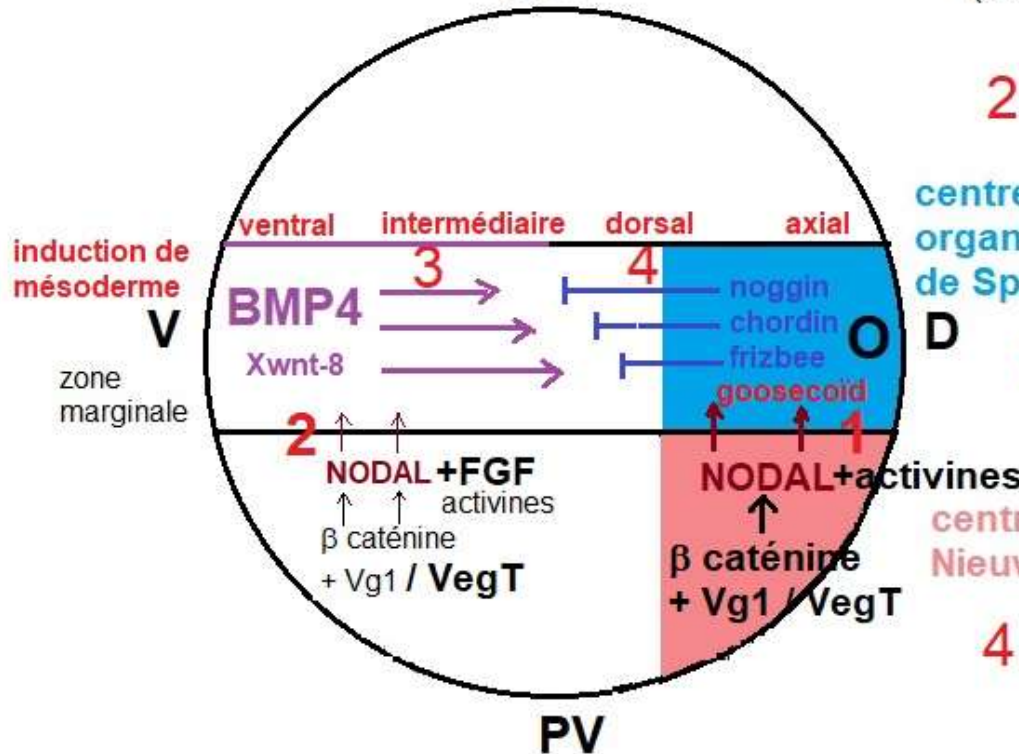
Le centre de Spemann dorsalise le mésoderme adjacent

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



stade blastula

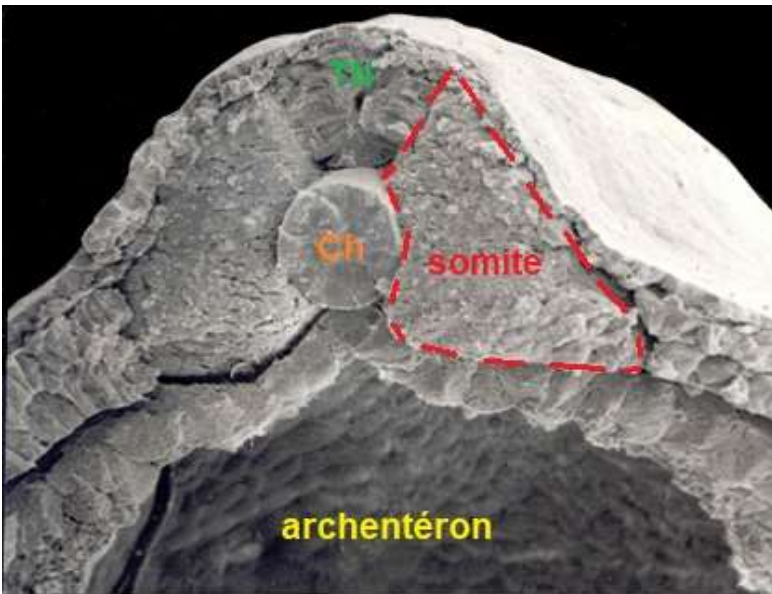
PA



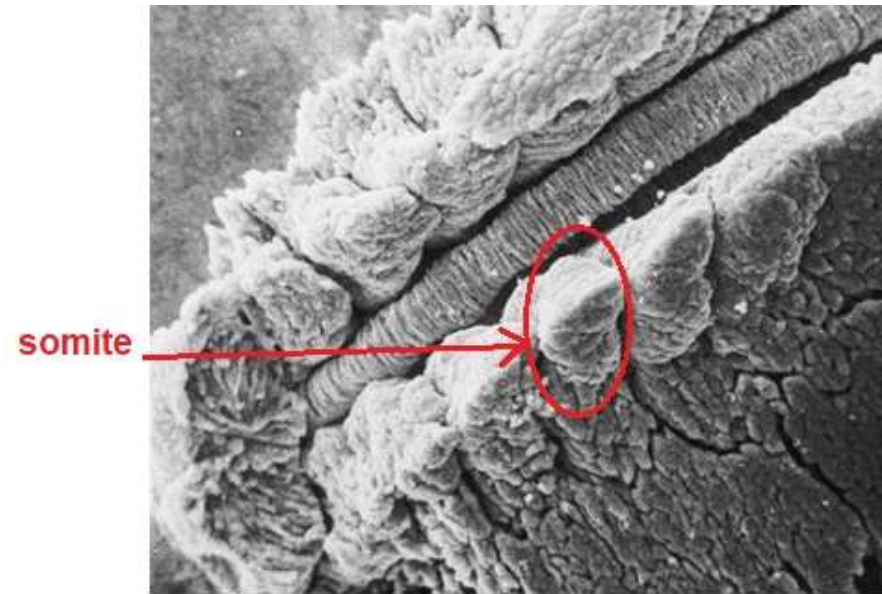
1. Le CN induit le centre organisateur de Spemann (concentration élevée de NODAL)
2. Les blastomères ventro-végétatifs induisent la zone marginale en mésoderme (faible concentration de NODAL)
3. Le mésoderme ventral émet des signaux ventralisants régionalisant le mésoderme
4. Le centre organisateur de Spemann émet des signaux dorsalisants qui bloquent les signaux ventralisants

La différenciation dorso-ventrale du mésoderme

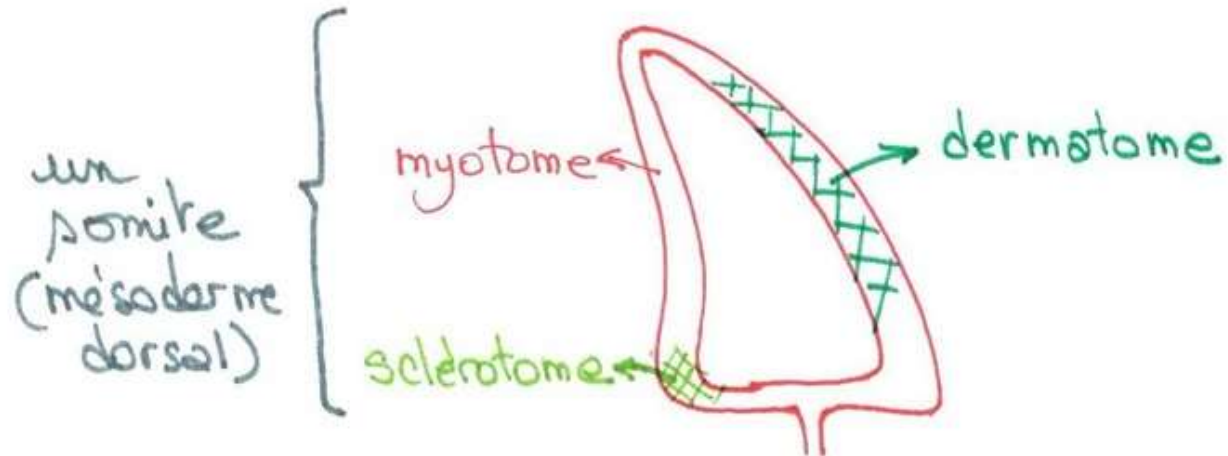
La différenciation des somites

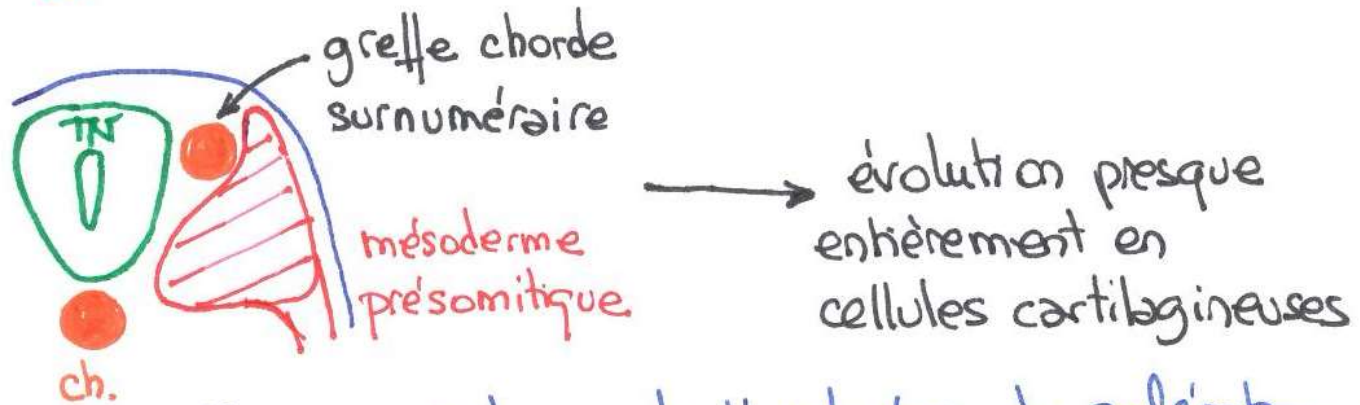
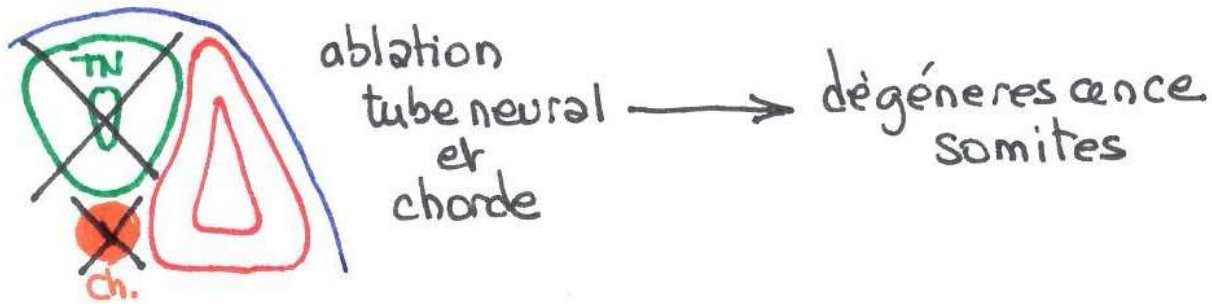
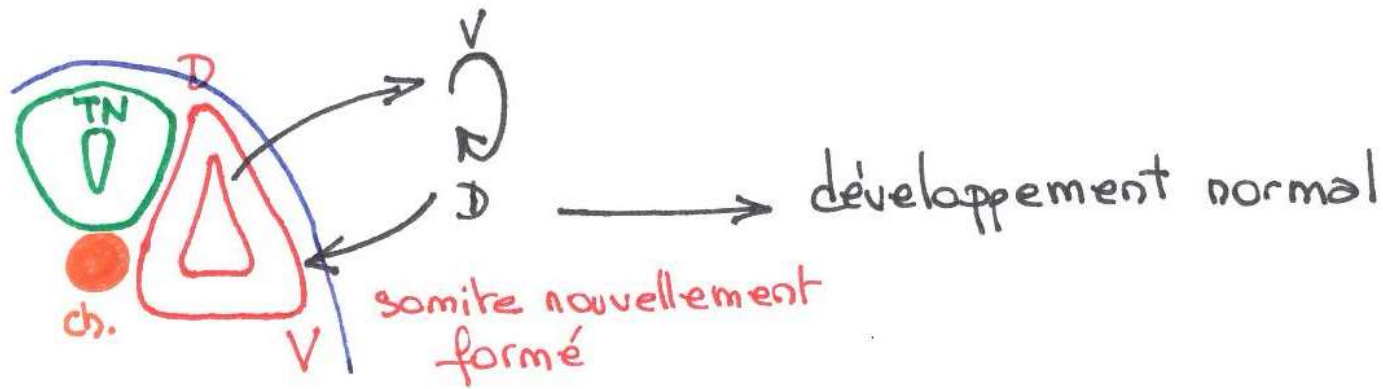


CT région dorsale neurula



Vue dorsale neurula disséquée





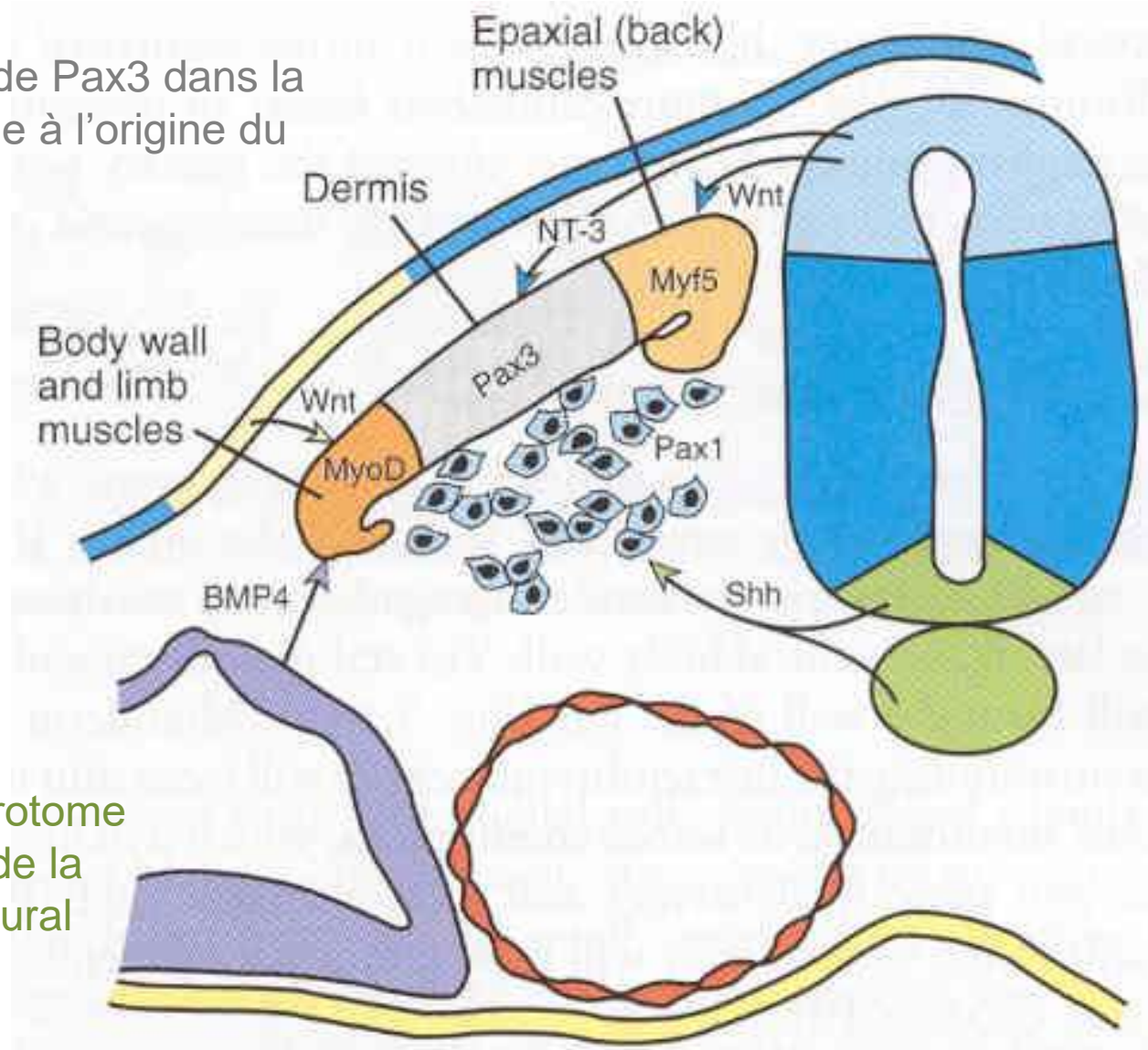
Mise en évidence de l'induction du sclérotome

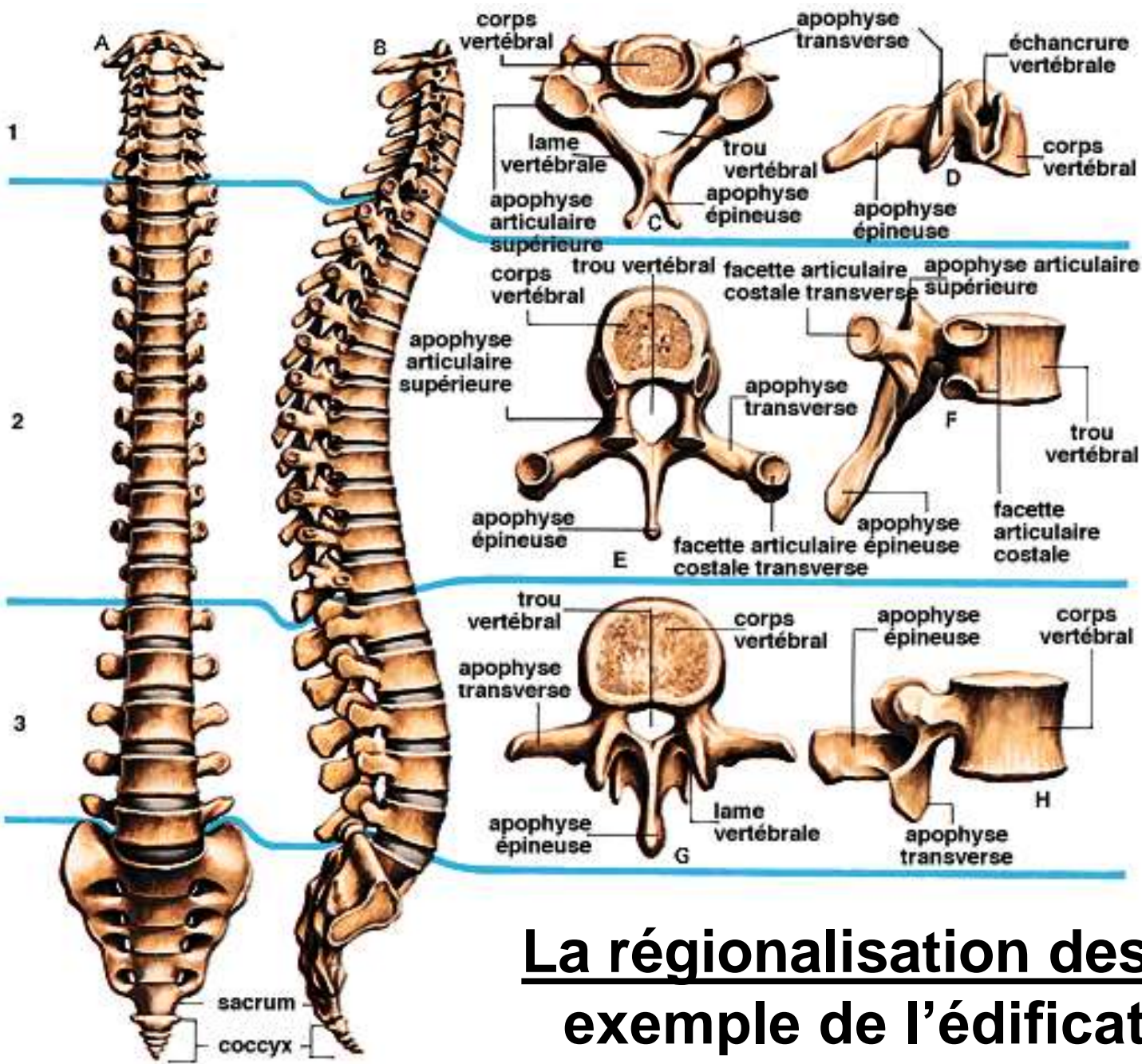
Schéma très simplifié de la détermination des dérivés des somites

Domaine d'expression de Pax3 dans la région dorsale et latérale à l'origine du dermomyotome

Domaine d'expression de Pax1 dans la partie ventrale du somite à l'origine du sclérotome

Sonic hedgehog (Shh) : signal d'induction du sclérotome provenant de la corde et de la partie ventrale du tube neural





**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.

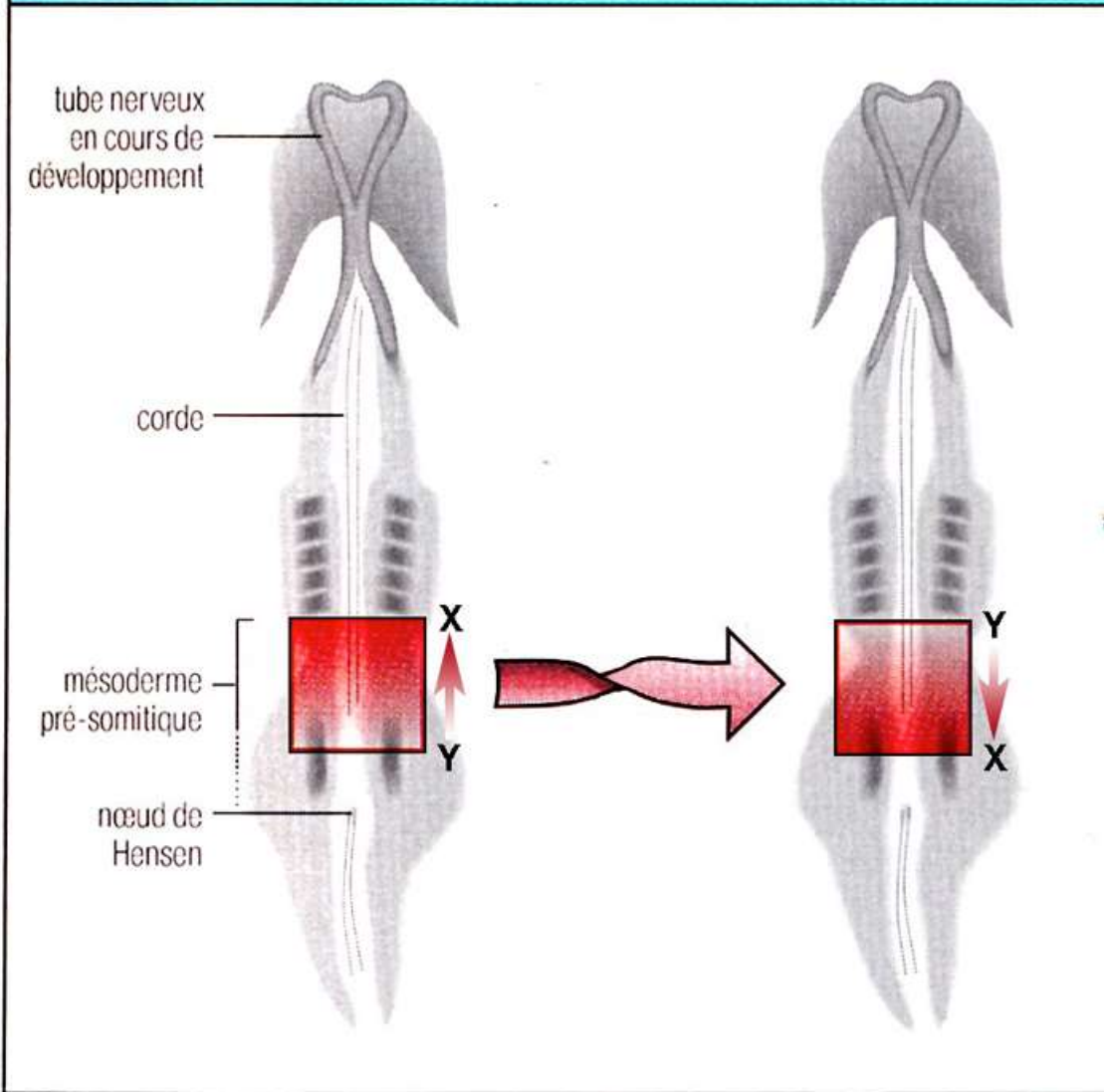
A droite : à 38 h d'incubation, la neurulation se poursuit et on reconnaît dans la région antérieure le cerveau passant du stade 3 au stade à 5 vésicules, avec les vésicules optiques latéralement.

Une dizaine de somites est formée.

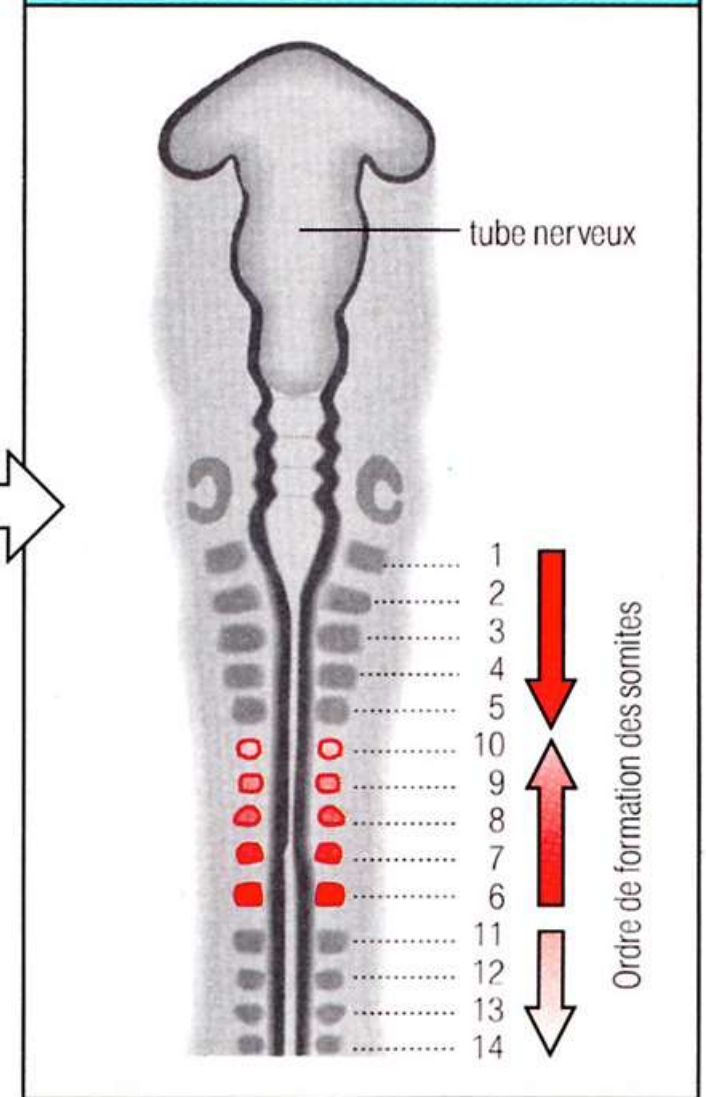


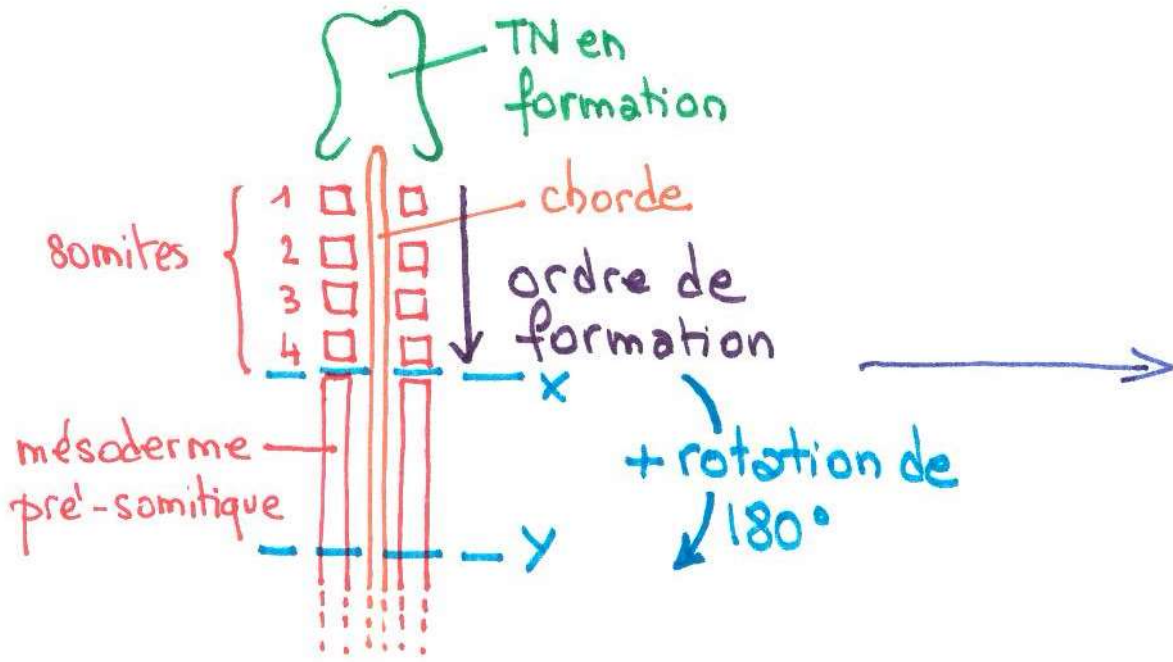
Expérience d'inversion des somites

Inversion du mésoderme pré-somitique

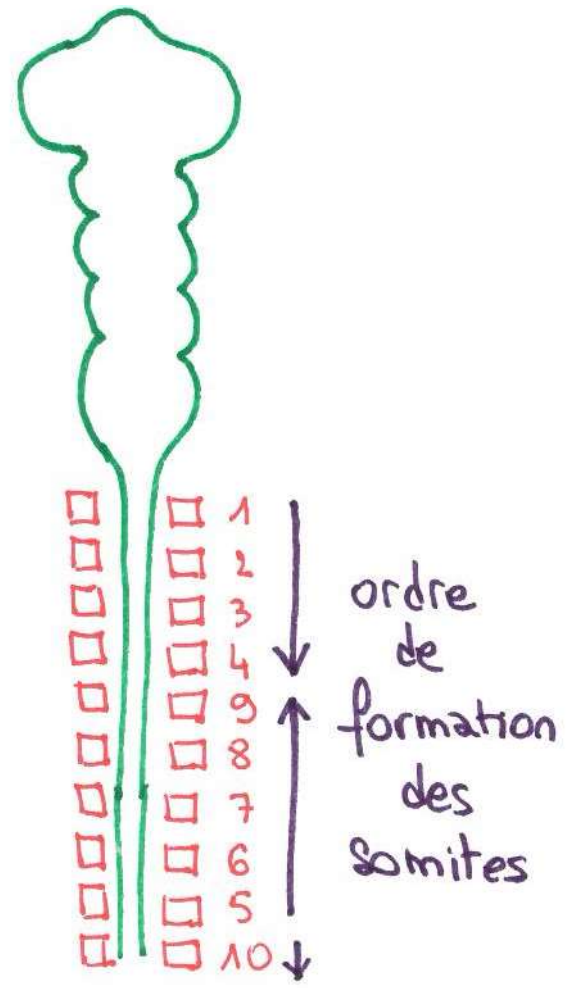


Formation des somites en ordre inverse

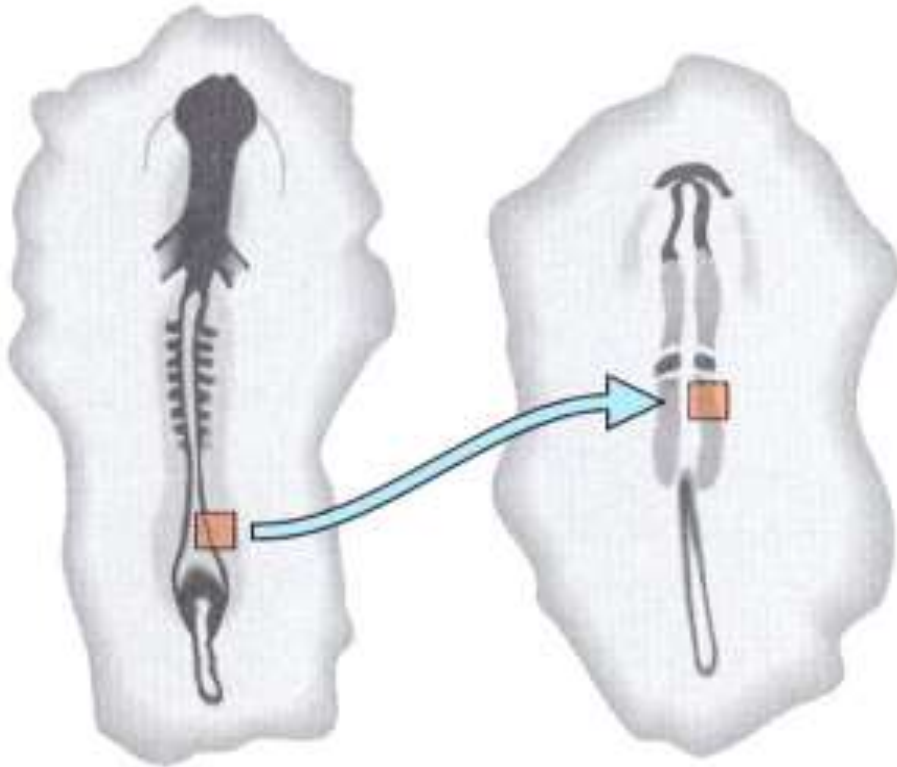




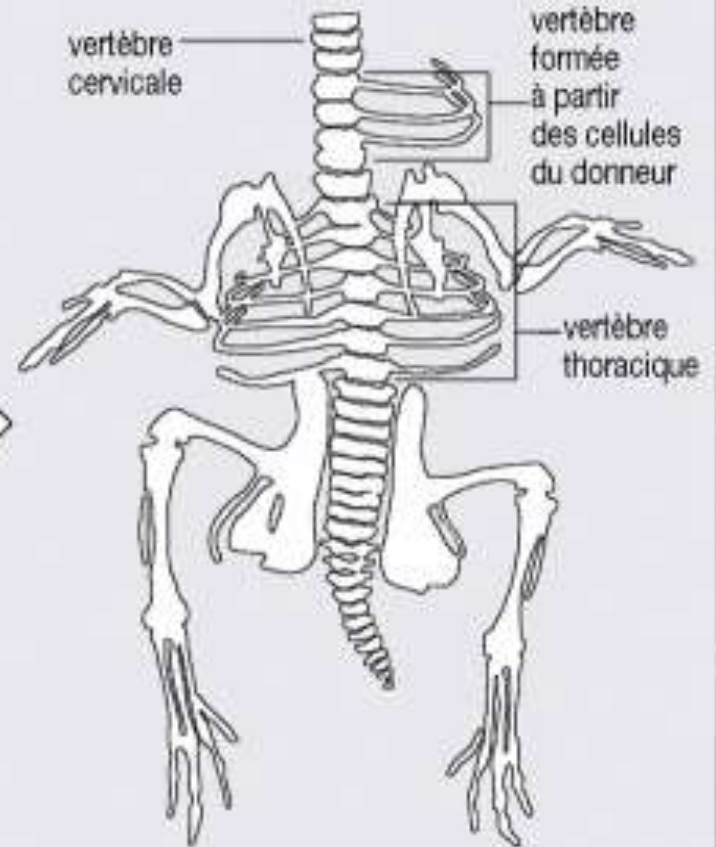
Mise en évidence de la
détermination de l'ordre
d'apparition des somites



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



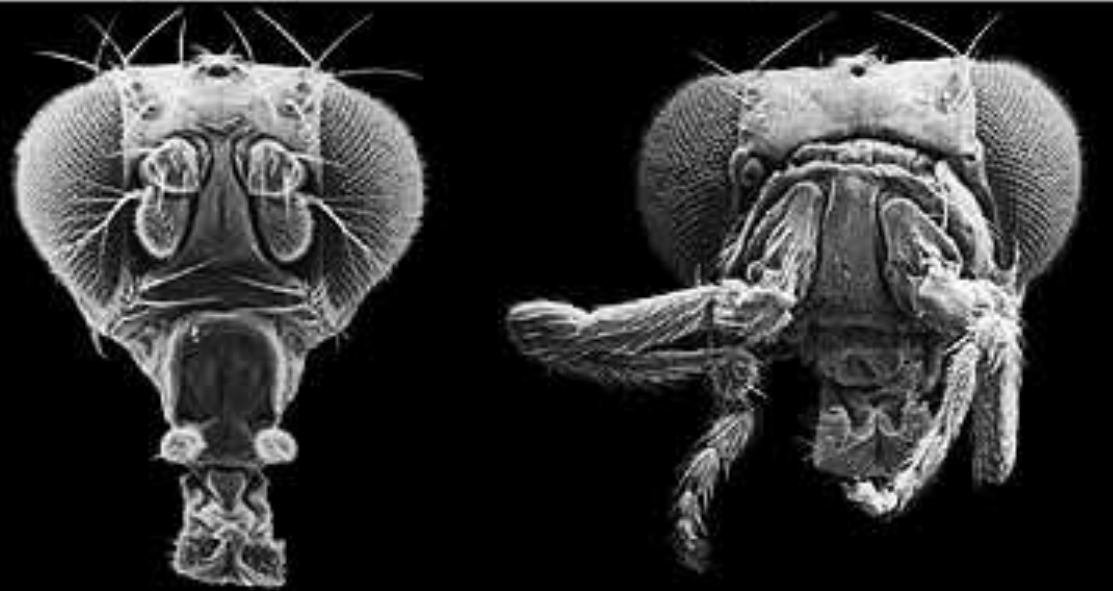
Le squelette de l'embryon-hôte à 9 jours montre le développement de vertèbres thoraciques dans la région cervicale



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

wild-type *Drosophila*

antennapedia mutant



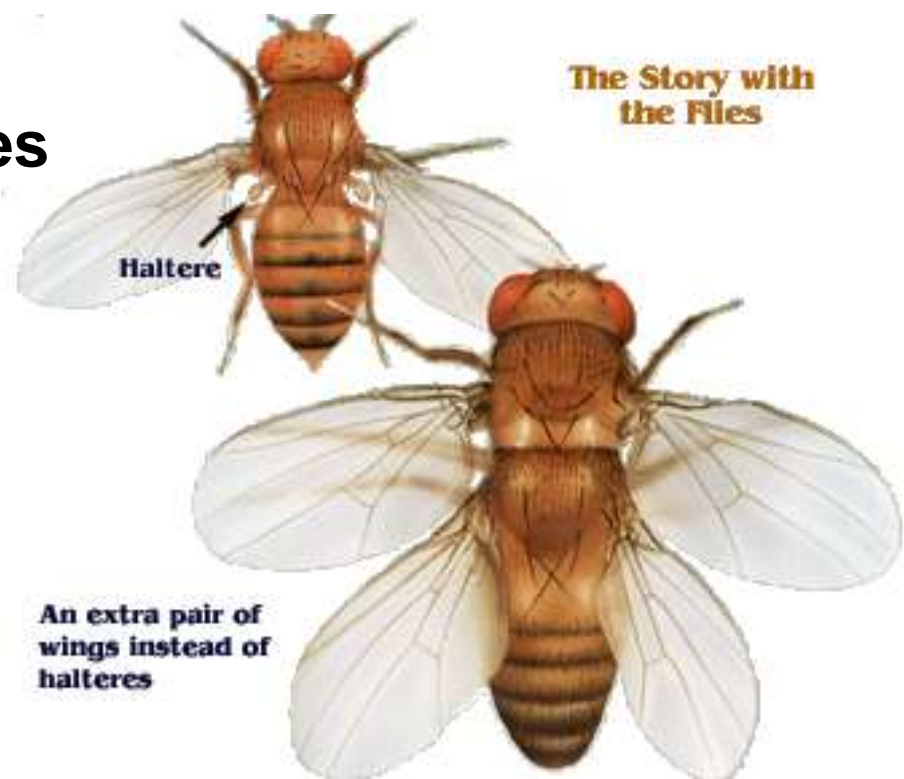
Faces antérieures de têtes de drosophile de type sauvage (A) et mutante homéotique (B).

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.

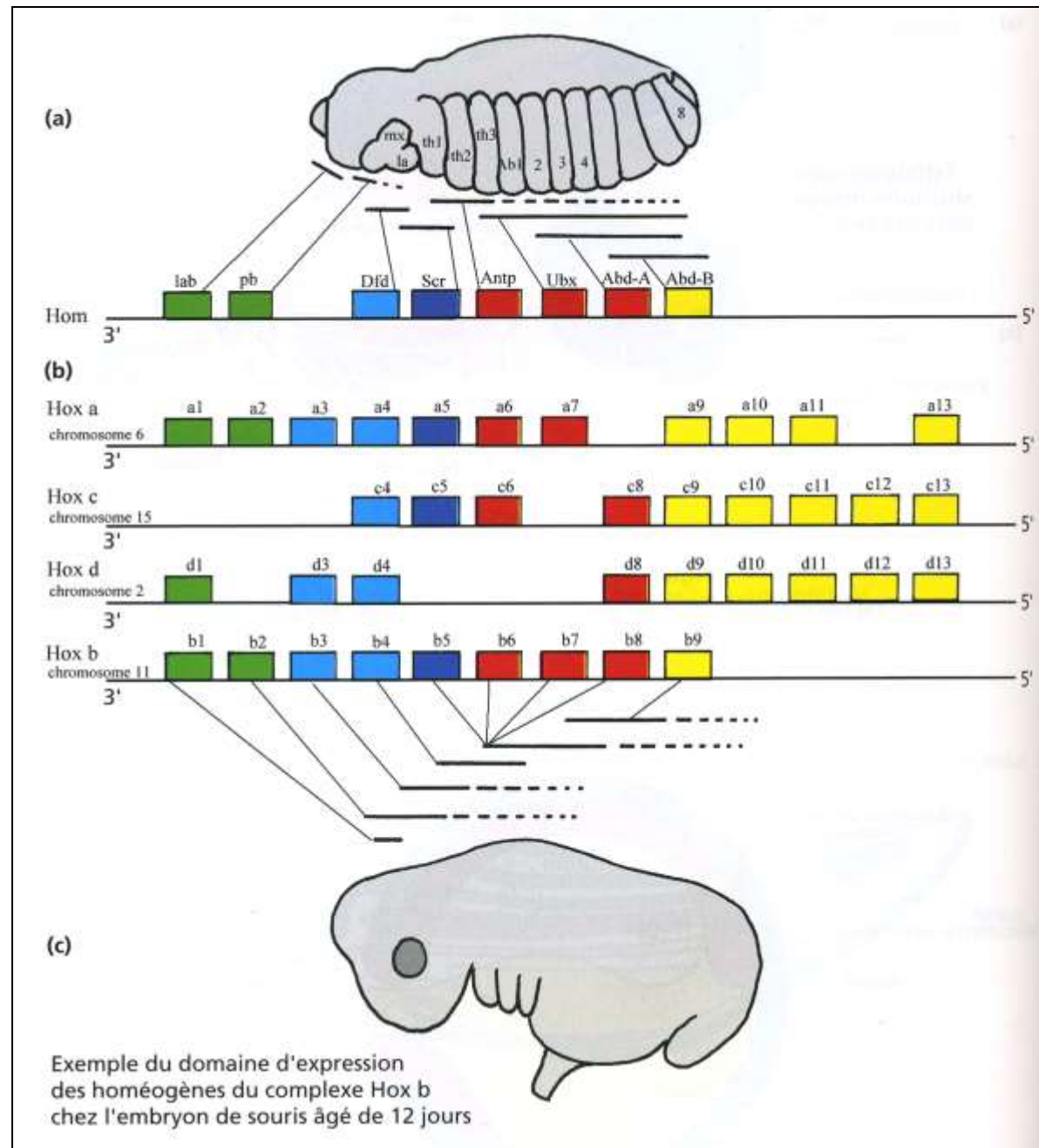
a. Gènes Hom chez la Drosophile,

b. Gènes Hox chez la Souris,

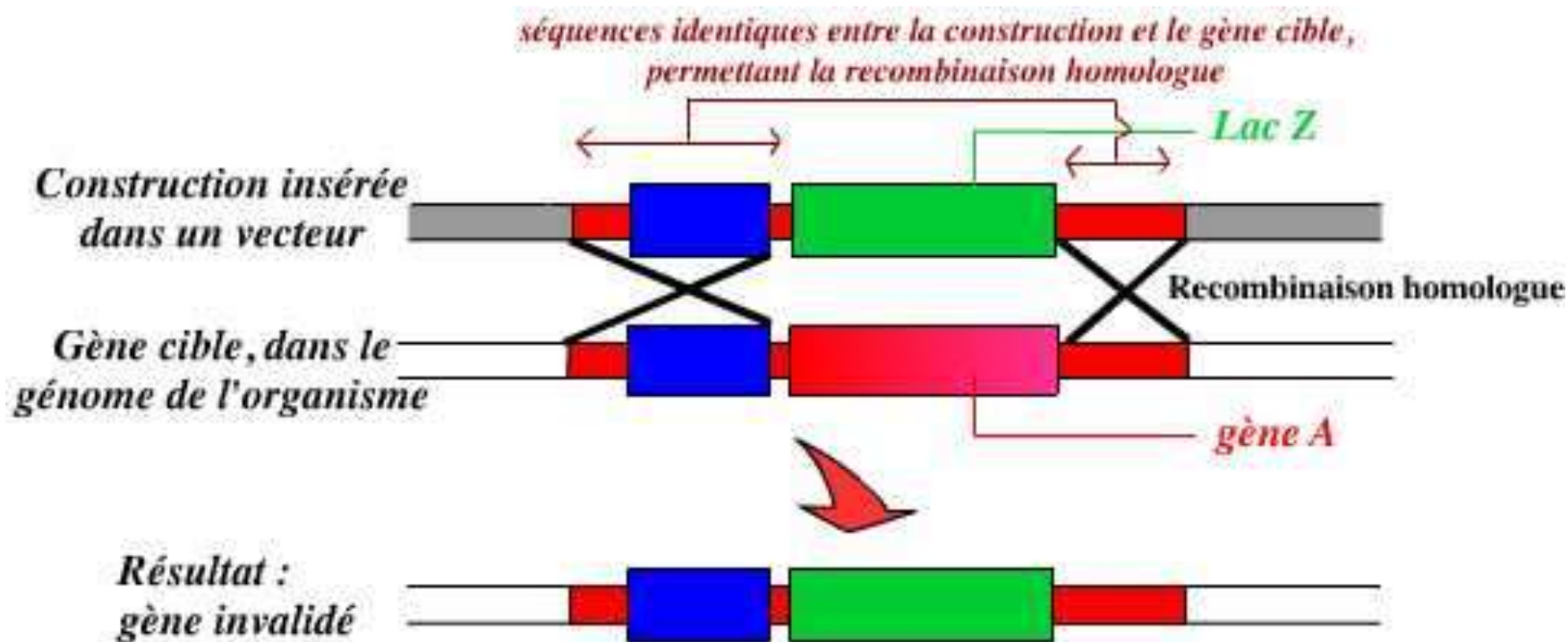
c. Expression des gènes Hox chez la Souris.

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).

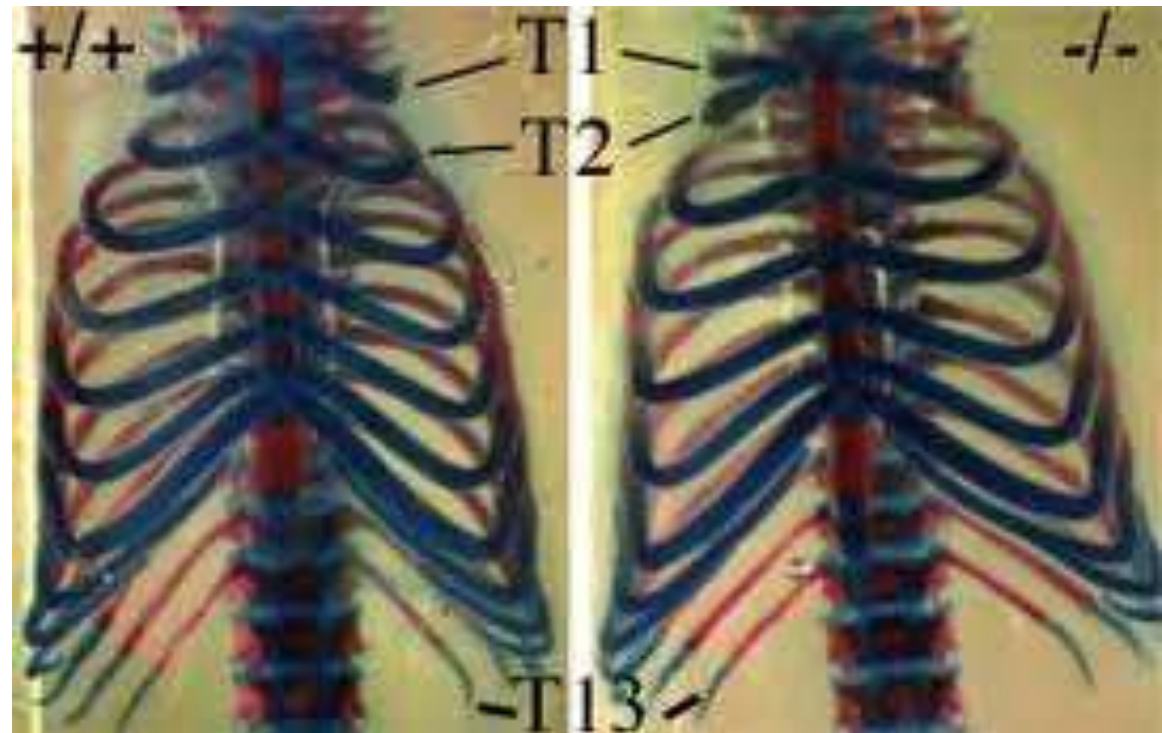
Cette technique est basée sur la recombinaison homologue entre un vecteur et le génome d'une cellule souche embryonnaire. Une fois modifiée, cette cellule est injectée dans de très jeunes embryons de souris : il en résulte des souris mosaïques. Celles dont la lignée germinale est modifiée sont sélectionnées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

Document 13.

Localisation et domaines d'expression des gènes à homéoboîte.

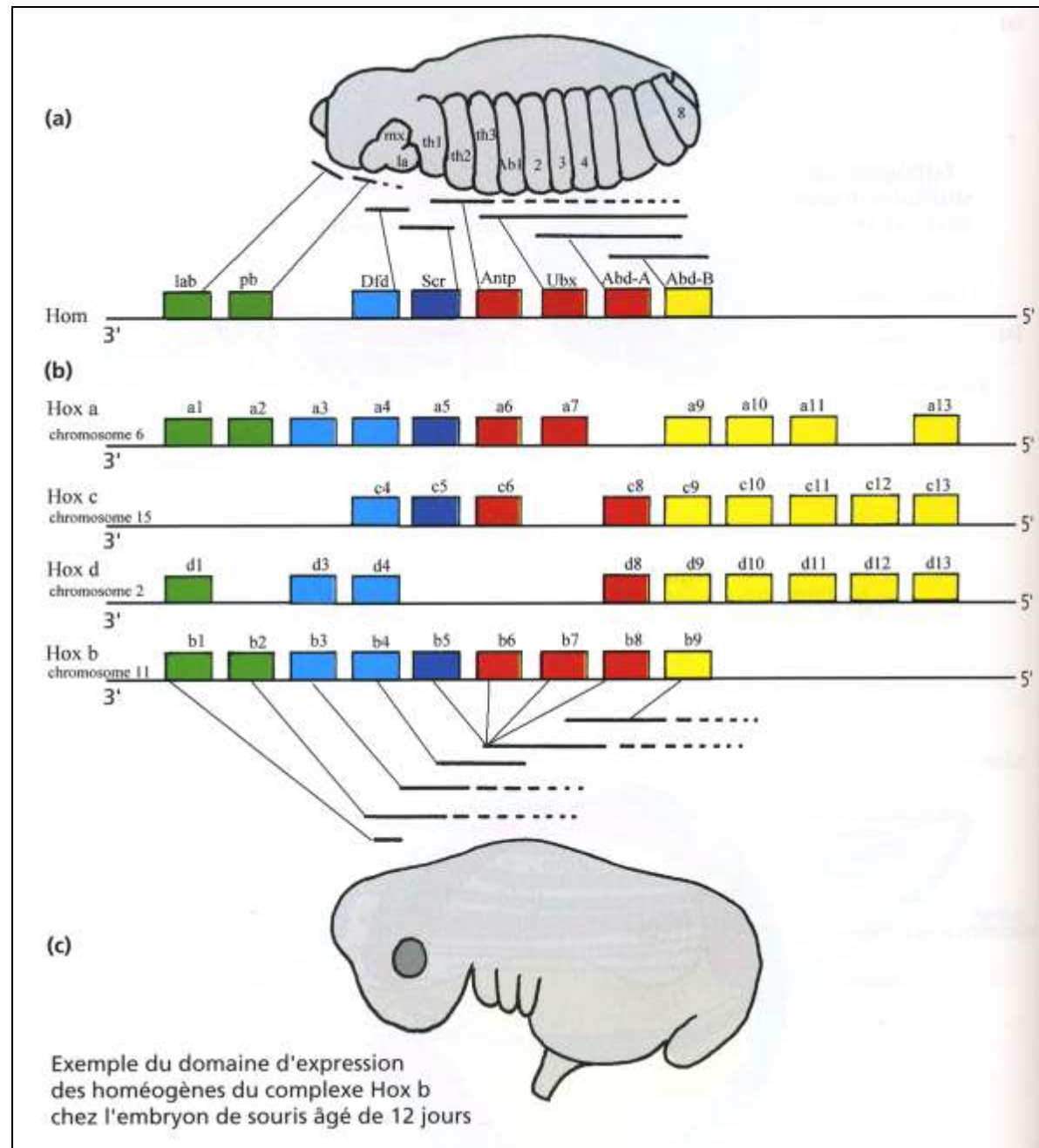
a. Gènes Hom chez la Drosophile,

b. Gènes Hox chez la Souris,

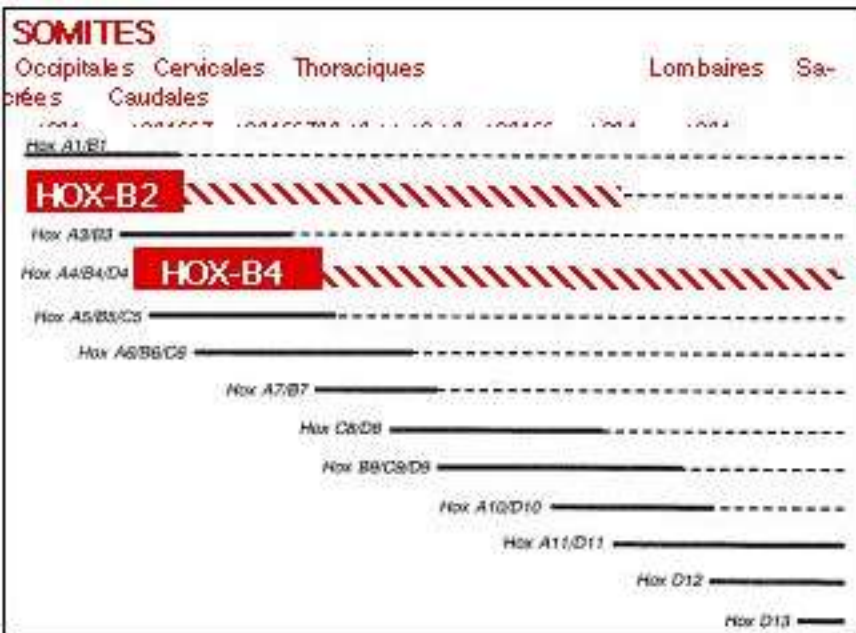
c. Expression des gènes Hox chez la Souris.

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

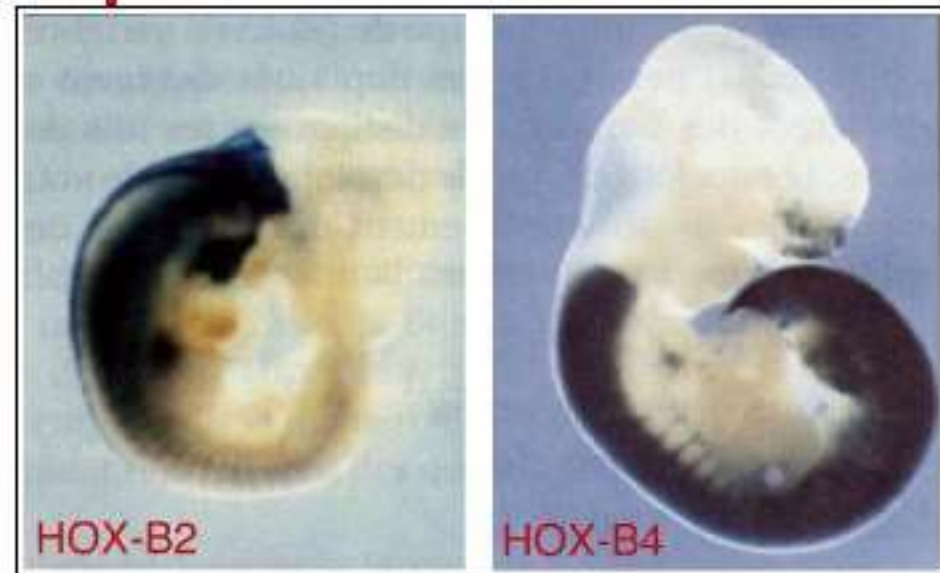
[PEYCRU P. et coll., " Biologie 1^{ère} année BCPST ", Dunod Ed., 2007].



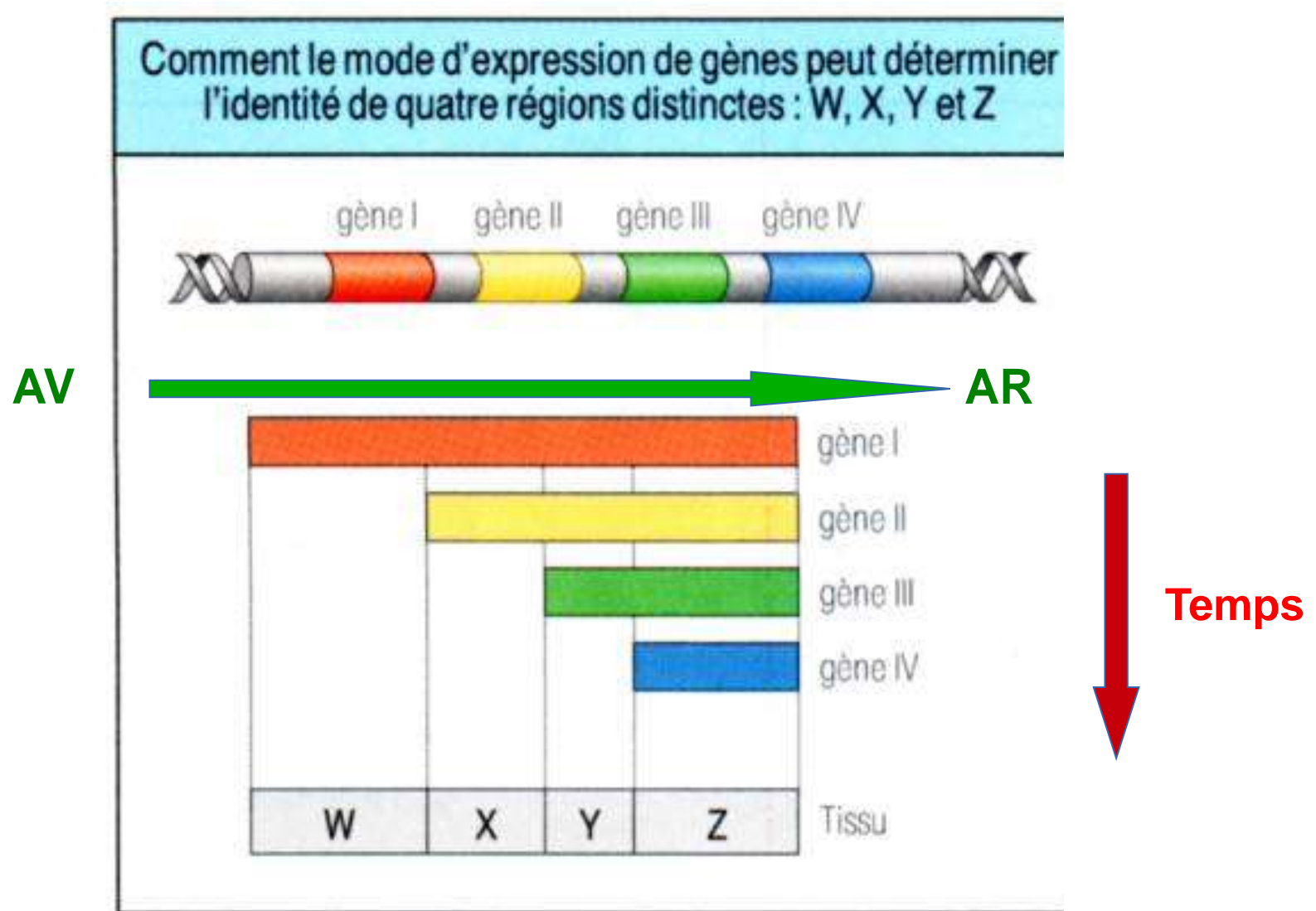
Domaines d'expression de gènes Hox-B2 et Hox-B4 chez la Souris



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



Modulation de l'expression des gènes homéotiques par l'acide rétinoïque

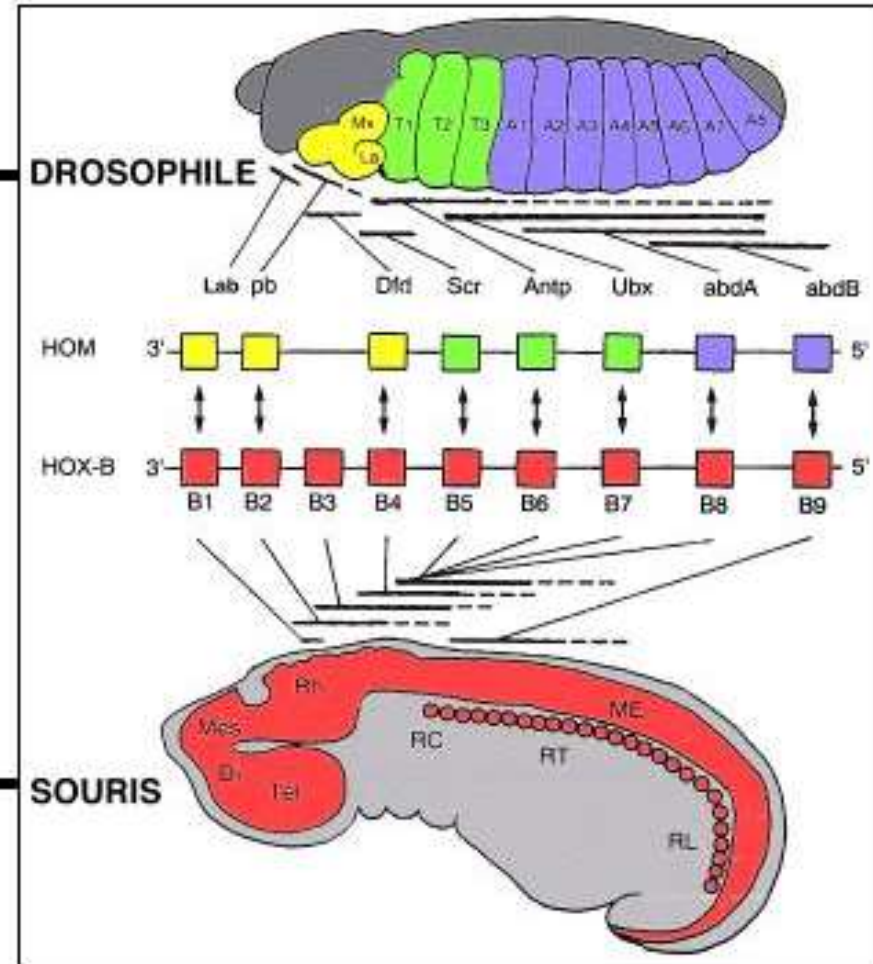
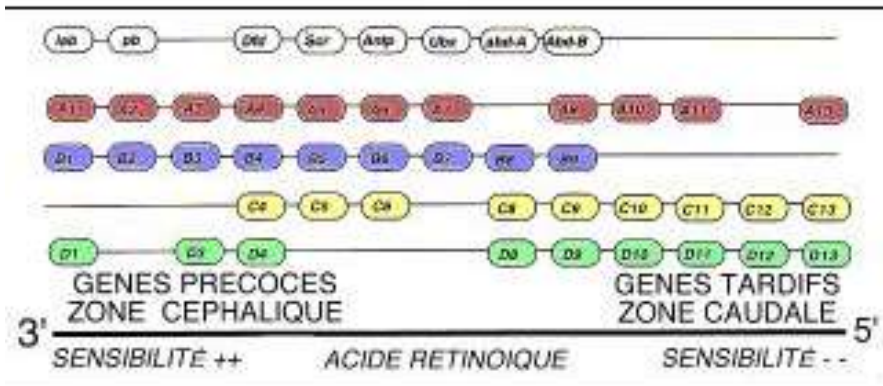
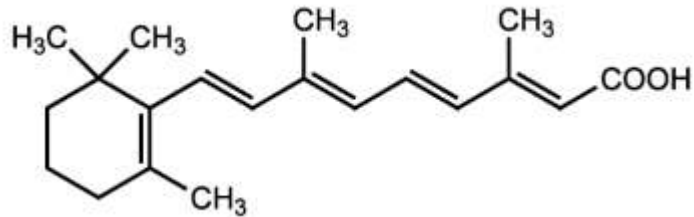


Figure 12

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].

