Lewis Wolpert • Cheryll Tickle • Alfonso Martinez Arias Peter Lawrence • Andrew Lumsden • Elizabeth Robertson • Jim Smith

Biologie du développement Les grands principes

5° édition

Traduit de l'anglais sous la direction de Jean Foucrier

DUNOD

Biologie du développement : les grands principes was originally published in English in 2015 under the title *Principles of Development*. This translation is published by arrangement with Oxford University Press. Dunod is solely responsible for this translation from the original work and Oxford University Press have no liability for any errors, omissions or inaccuracies or ambiguities in such translation or for any losses caused breliance thereon.

L'édition originale de cet ouvrage a été publiée en anglais en 2015 sous le titre *Principles of Development.* Cette traduction est publiée en accord avec *Oxford University Press.* Dunod est seule responsable de cette traduction de l'œuvre originale et Oxford University Press n'a aucune responsabilité en cas d'erreurs, omissions ou inexactitudes.

© Oxford University Press 2015

Illustration de couverture : alevin d'esturgeon du Danube (Acipenser ruthenus) © Kletr - Fotolia.com



Pour aller plus loin et mettre toutes les chances de votre côté, des ressources complémentaires sont disponibles sur le site www.dunod.com.

Connectez-vous à la page de l'ouvrage (grâce aux menus déroulants, ou en saisissant le titre, l'auteur ou l'ISBN dans le champ de recherche de la page d'accueil). Sur la page de l'ouvrage, sous la couverture, cliquez sur le lien « LES + EN LIGNE ».

© Dunod, 2017 pour la traduction française

11 rue Paul Bert, 92240 Malakoff

www.dunod.com

ISBN 978-2-10-076869-1

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 1224).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

Préface de l'édition française

Si l'on mesure la valeur d'un traité scientifique tel que celui-ci au nombre de rééditions qui en ont suivi la première parution en 1999, on peut d'emblée le classer parmi les meilleurs dans sa catégorie. À la suite du premier traité, celui-ci est le second à être traduit en langue française. On peut donc en déduire qu'il est, à juste titre, apprécié par les étudiants, les chercheurs et les enseignants dans notre pays.

L'un des critères qui incite à se le procurer et à se l'approprier intellectuellement est, avant tout, qu'il traite d'un sujet central des sciences de la vie : la biologie du développement, c'est-à-dire la construction progressive et fidèle à travers les générations, d'un embryon puis d'un adulte dans toute sa complexité à partir d'une unique cellule, l'œuf fécondé.

Sur les mécanismes qui sous-tendent ce phénomène qui, quoique banal, n'en est pas moins extraordinaire, des progrès considérables de nos connaissances n'ont cessé de s'accumuler au cours de la deuxième moitié du siècle précédent et de ces dernières décennies. Ils sont le résultat de la coopération de l'embryologie avec la biochimie, la génétique et la biologie moléculaire. De cette nouvelle approche a émergé la notion qu'une étonnante unité sous-tend la « biodiversité » telle que nous la livrait la seule observation des formes vivantes qui peuplent la planète. Les recherches modernes montrent, en effet, que des principes qui ont une valeur générale pour toutes les espèces animales, émergent des études de leur développement lorsque l'on considère, non plus seulement leurs formes, mais les mécanismes par lesquels celles-ci sont établies au cours de l'ontogenèse. Ainsi s'est substituée à l'embryologie, la biologie du développement et a émergé la notion qu'une réelle unité sous-tend la biodiversité que nous livre la simple observation des organismes.

Le présent ouvrage, comme les précédents du même auteur, porte bien son titre : en anglais : *Principles of development*, traduit en français par *Biologie du développement : Les grands principes*, car ce sont les mécanismes qui contrôlent le développement qui sont mis en lumière, plutôt que les détails expérimentaux qui ont amené à les découvrir. Ceux-ci peuvent, si besoin est, être facilement trouvés par le lecteur dans les références à des articles de revues écrits par des spécialistes et fournis à la fin de chaque chapitre. Soulignons aussi que chacun des quatorze chapitres de ce traité est accompagné d'un résumé synthétique, illustrant les qualités didactiques de l'ouvrage. À ceci s'ajoute, à la fin du volume, un glossaire très complet qui permet à l'étudiant et au non-spécialiste d'appréhender pleinement le contenu du texte.

L'illustration abondante et judicieuse des différents chapitres mérite une mention particulière. Comme dans les éditions précédentes, les schémas, souvent porteurs de notions complexes, sont étonnants par leur simplicité associée à un caractère remarquablement suggestif et explicatif.

Le contenu scientifique de la présente édition est nettement enrichi et actualisé par rapport aux précédentes. Il suit le rythme rapide des recherches et des découvertes dans ce domaine central des sciences de la vie. Les notions fondamentales comme la mise en place des coordonnées du futur organisme et l'arrangement des organes et tissus qui le constitueront (en anglais, la mise en place d'un *pattern*), la différenciation cellulaire, la morphogenèse, l'organogenèse, avec une attention spéciale au

développement du système nerveux, la fécondation font l'objet de l'essentiel de l'ouvrage sous une forme qui intègre les découvertes récentes. Une attention particulière est consacrée aux données qui peuvent avoir un intérêt médical. Le développement des plantes, généralement absent dans les traités de ce genre et qui figurait déjà dans la première édition, est ici actualisé. Mais cette nouvelle version a le mérite de donner une place importante à des domaines qui ont connu une évolution récente. Il en est ainsi, par exemple, des *cellules souches* dont le rôle dans le renouvellement constant des tissus chez de nombreux organismes est longtemps resté insoupçonné. L'utilisation des cellules souches comme source d'une médecine régénérative est également soulignée et les données sur le développement de l'embryon humain sont particulièrement bienvenues. Par le passé, elles étaient exclusivement réservées aux ouvrages destinés aux étudiants en médecine... Cette évolution est sans doute en rapport avec la progression des applications médicales de la biologie du développement dans des domaines comme la génétique clinique et la médecine régénérative par exemple.

Les recherches en biologie du développement continuent à progresser à un rythme étonnamment rapide. Les cinq éditions de ce livre, conçu et écrit par Lewis Wolpert et les éminents spécialistes qui l'ont accompagné, constituent d'ores et déjà une précieuse indication de l'évolution de cette discipline sur une période de dix-huit années.

On peut en recommander la lecture à tous ceux qui s'intéressent à la biologie, car c'est au cours du développement des organismes que l'on peut trouver l'explication de leur futur fonctionnement et souvent aussi ses déficiences.

> Nicole M. Le Douarin Professeur honoraire au Collège de France Secrétaire Perpétuelle Honoraire de l'Académie des Sciences

À propos des auteurs

Lewis Wolpert est professeur émérite de biologie appliquée à la médecine au département d'anatomie et de biologie du développement de l'UCL (University College London) de Londres (Royaume-Uni). Il est aussi l'auteur de *The Triumph of the Embryo, A Passion for Science, The Unnatural Nature of Science* et *Six Impossible Things Before Breakfast.*

Cheryll Tickle est professeur émérite au département de biologie et biochimie de l'université de Bath (Royaume-Uni).

Alfonso Martinez Arias est professeur de mécanique du développement à l'université de Cambridge (Royaume-Uni).

Peter Lawrence travaille au département de zoologie de l'université de Cambridge (Royaume-Uni). Il est membre émérite du Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology à Cambridge. Il est aussi l'auteur de *The Making of a Fly*.

Andrew Lumsden est professeur de neurobiologie du développement et directeur émérite du Medical Research Council Centre for Developmental Neurobiology au King's College de Londres (Royaume-Uni). Il est aussi le co-auteur de *The Developing Brain*.

Elizabeth Robertson est chercheuse à la fondation Wellcome Trust et professeure à la Sir William Dunn School of Pathology à l'université d'Oxford (Royaume-Uni).

Elliot Meyerowitz est professeur de biologie et dirige le département de biologie au California Institute of Technology à Pasadena (États-Unis).

Jim Smith est directeur du Medical Research Council National Institute for Medical Research de Londres (Royaume-Uni).

Eleanor Lawrence est éditrice et auteure scientifique freelance.

Matthew McClements est illustrateur. Il est spécialisé dans les dessins scientifiques, techniques et médicaux.

L'équipe de traducteurs

Jean Foucrier (chap. 5 et 10, contribution chap. 4, 6, 11 et 13). Professeur honoraire des universités. Ancien élève de l'ENS de Saint-Cloud, agrégé, docteur d'État ès-Sciences en 1986, nommé professeur de biologie du développement à l'université Paris-Nord (Paris13) en 1988, et responsable du laboratoire de biologie du développement et de la différenciation à l'UFR SMBH-Léonard de Vinci de Bobigny. À partir de 1995, exerce ses activités de recherche et d'enseignement en tant que Professeur de biologie à l'université Paris 12-Val de Marne à la Faculté des sciences et technologie, rattaché en recherche au laboratoire CRRET puis à l'unité Inserm U955 à l'UFR de médecine de Paris 12. Responsable du département de biologie et du Master biologie santé de l'université Paris-Est Créteil (UPEC) jusqu'en 2012, année de cessation d'activité. Auteur de plusieurs ouvrages pédagogiques de biologie cellulaire, du développement et de la reproduction.

Yann Bassaglia (chap. 8 et 9). Agrégé, Maître de conférences. Université Paris-Est Créteil (UPEC), UMR MNHN/CNRS 7208-BOREA.

Josette Cadusseau (chap. 1 et 12, contribution chap. 12). Professeur des universités. Université Paris-Est Créteil (UPEC), IMRB, Inserm U955, Créteil.

Juliette Rochet (chap. 3 et 7). Agrégée, docteur en écologie des communautés, PRAG, UFR Sciences et Technologie. Université Paris-Est Créteil (UPEC). Équipe Ecophys, IEES, Paris.

Olivier Stettler (chap. 2, contribution chap.4). Professeur des universités. Université Paris-Est Créteil (UPEC). CRRET, ERL 9215 CNRS, Créteil.

Michel Vervoort (chap. 14, contribution chap. 6, 11 et 13). Professeur des universités. Université Paris Diderot, Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS, Paris.

La biologie du développement constitue une discipline majeure et passionnante de la biologie. Cet ouvrage, en mettant en lumière ses principes généraux acquis par de nombreuses approches conceptuelles et expérimentales, a suscité une volonté chez les membres de l'équipe de traduction, de rendre accessible au plus grand nombre les données scientifiques ayant permis leur mise en évidence. Que les membres de cette équipe soient ici chaleureusement remerciés pour leur forte implication et le souci qu'ils ont eu de rendre, dans le respect des textes originaux, la richesse du contenu de cet ouvrage.

Jean Foucrier

Table des matières

Préface de l'édition française	iii
À propos des auteurs	v
L'équipe de traducteurs	vi
Liste des encarts	xvi
Avant-propos	xviii
Remerciements	xx
Abréviations	xxi
Chapitre 1 Histoire et concepts de base	1
Les origines de la biologie du développement	3
1.1 Aristote définit pour la première fois la question	
de l'épigenèse <i>versus</i> la préformation	З
Encart 1A Étapes fondamentales du développement de Xenopus laevis	4
1.2 La théorie cellulaire a changé les conceptions sur le	4
1 2 Deux trace existing und développement furent	4
initialement proposés	6
Encart 1B Le cycle cellulaire de la mitose	7
1.4 La découverte de l'induction montra qu'un groupe de cellules pouvait déterminer le développement des cellules voisines	8
1.5 La biologie du développement émergea de l'union de la génétique et de l'embryologie	8
1.6 Le développement est étudié avant tout au travers d'organismes modèles	9
1.7 Les premiers gènes du développement ont été identifiés grâce à des mutations spontanées	11
Résumé	13
Un outil conceptuel	13
1.8 Le développement inclut l'émergence du patron d'organisation, le changement de forme, la différenciation	
cellulaire et la croissance	14
Encart 1C Feuillets embryonnaires	15
1.9 Le comportement cellulaire fait le lien entre action des gènes et processus du développement	17
1.10 Les gènes contrôlent le comportement cellulaire en déterminant les protéines à synthétiser	17
1.11 L'expression des gènes du développement est sous un contrôle strict	19
Encart 1D Observer l'expression des gènes chez l'embryon	20
1.12 Le développement est progressif et la destinée des cellules se détermine à des moments différents	22
1.13 Les interactions inductrices rendent les cellules différentes les unes des autres	24

Encart 1E Transduction du signal et voies de signalisation	
intracellulaires	26
1.14 La réponse aux signaux inducteurs dépend de l'état	20
	20
1.15 La mise en place du patron de formation peut impliquer "interprétation d'informations de position	27
Encart 1F Quand le développement est défectueux	28
1.16 L'inhibition latérale peut générer des patrons spatiaux	30
1.17 La localisation de déterminants cytoplasmiques et la division cellulaire asymétrique peuvent conduire à des cellules filles distinctes	30
1.18 L'embryon contient un programme générateur plutôt que descriptif	31
L.19 L'infaillibilité du développement est atteinte de plusieurs façons	32
1.20 La complexité du développement embryonnaire est due à la complexité même des cellules	32
1.21 Le développement est un élément clé de l'évolution	33
Résumé	34
Résumé du Chapitre 1	34
Chapitre 2 Mise en place du plan d'organisation	
de la drosophile	37
Cycle vital et développement général de la drosophile	38
2.1 L'embryon précoce de drosophile est un syncytium	38
2.2 La cellularisation est suivie de la gastrulation et la segmentation	40
2.3 Après l'éclosion, la larve de drosophile se développe à	
travers différents stades larvaires, forme une pupe, puis se métamorphose en adulte	41
2.4 De nombreux gènes du développement ont été identifiés chez la drosophile par criblage génétique à grande échelle	41
Encart 2A Mutagenèse et stratégie de criblage génétique pour identifier des mutants de développement chez la drosophile	43
Résumé	44
1ise en place des axes embryonnaires	44
2.5 Les axes corporels sont établis alors que l'embryon de a drosophile n'est encore qu'un syncytium	44
2.6 Des facteurs maternels mettent en place les axes et ontrôlent le développement initial de la drosophile	46
2.7 Trois classes de gènes maternels spécifient l'axe antéro-postérieur	46
2.8 La protéine morphogène Bicoïd est distribuée selon un gradient antéro-postérieur	46

2.9 L'organisation postérieure est contrôlée par les gradients des protéines Nanos et Caudal	49
2.10 Les extrémités antérieure et postérieure de l'embryon sont déterminées par l'activation d'un récepteur membranaire	50
2.11 La polarité dorso-ventrale de l'embryon est déterminée par la localisation de protéines maternelles dans l'espace périvitellin	51
2.12 Dorsal génère une information de position le long de l'axe dorso-ventral	52
Résumé	53
Encart 2B La voie de signalisation Toll : une voie multifonctionelle	54
Localisation des déterminants maternels pendant l'ovogenèse	54
2.13 L'axe antéro-postérieur de l'œuf de drosophile est détermine par des signaux provenant de la chambre ovarienne et par des interactions entre l'ovocyte et les cellules folliculaires	≦ 55
Encart 2C La voie de signalisation JAK-STAT	57
2.14 La localisation des ARNm maternels aux extrémités de l'ovocyte dépend de la réorganisation de son cytosquelette	58
2.15 L'axe dorso-ventral de l'œuf est spécifié par un déplacement du noyau ovocytaire suivi par des signalisations entre l'ovocyte et les cellules folliculaires	60
Résumé	60
Mise en place de l'organisation de l'embryon précoce	61
2.16 L'expression des gènes zygotiques selon l'axe dorsoventral est contrôlée par la protéine Dorsal	61
2.17 La protéine Decapentaplegic agit comme un morphogène qui modèle la région dorsale de l'embryon	64
2.18 L'axe antéro-postérieur est subdivisé en grandes régions par l'expression des gènes gap	66
2.19 La protéine Bicoïd délivre un signal de position qui contrôle l'expression antérieure du gène <i>hunchback</i> zygotique	66
2.20 Le gradient de la protéine Hunchback active et réprime l'expression d'autres gènes gap	68
Encart 2D Transgénèse s'effectuant par l'intermédiaire de l'élément P	69
Encart 2E Expression de gènes cibles et dépistage de défauts d'expression	70
Résumé	71
Activation des gènes pair-rule et établissement des parasegments	71
2.21 Les parasegments sont délimités par les patrons d'expression périodiques des gènes pair-rule	72
2.22 L'activité des gènes gap détermine la position des bandes d'expression des gènes pair-rule	72
2.23 Les insectes utilisent différents mécanismes pour modeler leur architecture corporelle	75
Résumé	77
Les gènes de polarité segmentaire et l'organisation des segments	77
2.24 L'expression du gène <i>engrailed</i> définit les frontières parasegmentaires qui sont également des limites de restriction clonale	77

	70
frontieres parasegmentaires	/9
délimitent et organisent les futurs segments	79
Encart 2F La voie de signalisation Hedgehog	82
2.27 Les compartiments perdurent chez la mouche adulte	83
Encart 2G Les mutants affectant l'organisation des denticules donnent des informations sur l'organisation des segments	84
Encart 2H Mosaïques génétiques et recombinaison mitotique	86
2.28 Les cellules épidermiques des insectes deviennent polarisées individuellement suivant une direction antéro- postérieure dans le plan de l'épithélium	87
Encart 21 Polarité planaire chez la drosophile	88
Résumé	89
Spécification de l'identité segmentaire	90
2.29 Les gènes Hox spécifient l'identité des segments	
chez la drosophile	91
2.30 Les gènes sélecteurs homéotiques du complexe bithorax sont responsables de la diversification des sogments postériours	07
2 21 Le complexe Antennanedia contrôle la spécification	92
des régions antérieures	93
2.32 Cordre d'expression des genes Hox correspond à leur ordre sur le chromosome	93
2.33 La tête chez la drosophile est spécifiée par des gènes distincts des gènes Hox	94
Résumé	94
Résumé du chapitre 2	95
Charles D. Dévelopment des contélects la	
cycles de vie et techniques expérimentales	
Les cycles de vie des vertébrés et les grands traits de leur	103
נכז נענוכז עכ עוכ עכז עכו נכטוכז כו וכז צומוועז נומונז עכ וכעו	103
développement	103 104
développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour	103 104
développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation	103 104 107
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 	103 104 107 111
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent 	103 104 107 111
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce 	103 104 107 111 113
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce 3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus 	103 104 107 111 113 114
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce 3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus 3.5 Le zygote de souris est dépourvu de vitellus et son développement précoce implique des cellules dédiées à la formation du placenta et des membranes extra-embryonnaires 	103 104 107 111 113 114 119
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce 3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus 3.5 Le zygote de souris est dépourvu de vitellus et son développement précoce implique des cellules dédiées à la formation du placenta et des membranes extra-embryonnaires 3.6 Le développement précoce de l'embryon humain est similaire à celui de la souris 	103 104 107 111 113 114 119 123
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce 3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus 3.5 Le zygote de souris est dépourvu de vitellus et son développement précoce implique des cellules dédiées à la formation du placenta et des membranes extra-embryonnaires 3.6 Le développement précoce de l'embryon humain est similaire à celui de la souris 	103 104 107 111 113 114 119 123
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce 3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus 3.5 Le zygote de souris est dépourvu de vitellus et son développement précoce implique des cellules dédiées à la formation du placenta et des membranes extra-embryonnaires 3.6 Le développement précoce de l'embryon humain est similaire à celui de la souris Approches expérimentales pour étudier le développement des vertébrés 	103 104 107 111 113 114 119 123 125
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce 3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus 3.5 Le zygote de souris est dépourvu de vitellus et son développement précoce implique des cellules dédiées à la formation du placenta et des membranes extra-embryonnaires 3.6 Le développement précoce de l'embryon humain est similaire à celui de la souris Approches expérimentales pour étudier le développement des vertébrés Encart 3A Diagnostic génétique pré-implantatoire 	103 104 107 111 113 114 119 123 125 126
 développement 3.1 Le crapaud <i>Xenopus laevis</i> est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation 3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus 3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce 3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus 3.5 Le zygote de souris est dépourvu de vitellus et son développement précoce implique des cellules dédiées à la formation du placenta et des membranes extra-embryonnaires 3.6 Le développement précoce de l'embryon humain est similaire à celui de la souris Approches expérimentales pour étudier le développement des vertébrés Encart 3A Diagnostic génétique pré-implantatoire Encart 3B Profils d'expression génique par puces à ADN et séquençage d'ARN 	103 104 107 111 113 114 119 123 125 126 128

3.7 La cartographie de la destinée des cellules et le traçage du lignage révèlent quelles cellules de l'embryon précoce		ľu
donnent naissance aux structures adultes 3.8 Toutes les techniques ne s'appliquent pas à l'ensemble	129	4.
des vertébrés	131	CO
3.9 Des gènes du développement peuvent être identifiés grâce à des mutations spontanées et des criblages de		4.
mutagenèse à large échelle	132	si
Encart 3C Criblages de mutagenèse à large échelle seur de mutations économies abas la selecte pèter.	174	Re
3.10 Les techniques transgéniques permettent la production d'animaux porteurs de mutations dans des gènes spécifiques	134	ne
Encart 3D Le système Cre/loxP : une stratégie pour		4.
invalider des gènes chez la souris	138	m
transgenèse transitoire et par extinction génique	139	Ve
3.12 Les réseaux de régulation de gènes dans le		4. co
techniques d'immunoprécipitation de chromatine	139	4.
Résumé du Chapitre 3	140	4.
Chapitre 4 Développement des vertéhrés II.		m A
xénope et poisson-zèbre	144	4 . à
Mise en place des axes embryonnaires	145	Re
4.1 L'axe pôle animal-pôle végétatif est déterminé maternellement chez le xénope	145	Мі 4.
Encart 4A Signaux protéiques intercellulaires dans le développement des vertébrés	147	ра 4 .
Encart 4B La voie de signalisation Wnt/β-caténine	148	Ы
4.2 L'activation locale de la signalisation Wnt/ β -caténine spécifie le futur côté dorsal de l'embryon	149	ae 4 .
4.3 Des centres de signalisation se développent du côté dorsal de la blastula	151	en Re
Résumé	152	
Origine et spécification des feuillets embryonnaires	152	Cl
4.4 La carte des territoires présomptifs de la blastula		ac
de xénope rend compte du rôle de la gastrulation	153	Mi
précoce de xénope rend possible une régulation	154	5.
4.6 L'endoderme et l'ectoderme sont spécifiés par		рс
des facteurs materneis, tandis que le mesoderme est induit à partir de l'ectoderme par des signaux provenant de la		5. ľe
région végétative	154	s'e
Encart 4C Voie de signalisation de membres de la famille des facteurs de croissance TGF-β	157	la 5.
4.7 L'induction du mésoderme survient au cours d'une	157	in de
4.8 L'expression des gènes zygotiques débute à la	101	5.
transition blatuléenne	158	de
4.9 Les signaux d'induction du mésoderme et du plan primaire d'organisation sont produits par la région végétative, le contre organisateur, et le mésodorme ventral	150	
	ECT	5.

4.10 Les protéines de la famille TGF- β sont des inducteurs du mésoderme

	Encart 4D Étude de la fonction d'un récepteur par l'utilisation de mutations dominantes négatives	161
129	4.11 L'expression zygotique des signaux d'induction du mésoderme et du plan d'organisation est activée par l'action	
131	combinée des facteurs maternels VegT et Wnt	161
132	4.12 Des seuils de réponse aux gradients de protéines de signalisation modèlent le mésoderme	162
152	Résumé	164
134	Le centre organisateur de Spemann et l'induction	
1 2 5	neurale	164
122	Encart 4E La voie de signalisation FGF	165
138	4.13 Des signaux issus du centre organisateur structurent le mésoderme dorso-ventral en bloquant les effets des signaux ventraux	166
139	4.14 Émergence de l'axe antéro-postérieur de l'embryon au cours de la gastrulation	167
139	4.15 La plaque neurale est induite à partir de l'ectoderme	169
140	4.16 Le système nerveux est structuré par des signaux mésodermiques le long de l'axe antéro-postérieur	172
	4.17 Le plan d'organisation final de l'embryon se manifeste	
144	à la fin de la gastrulation et à la neurulation	173
145	Résumé	174
145	Mise en place du plan d'organisation du poisson-zèbre	174
147	4.18 Les axes corporels du poisson-zèbre sont établis par des déterminants maternels	175
147	4.19 Les feuillets embryonnaires sont spécifiés dans le blastoderme du poisson-zèbre par des signaux similaires	
140	de ceux du xénope	175
149	4.20 L'ecusson du poisson-zebre est l'organisateur embryonnaire comme celui de Spemann chez le xénope	177
151	Résumé du Chapitre 4	178
152	Chanitre 5 Développement des vertébrés III :	
152	achèvement du plan d'organisation corporel du	185
153	Mise en place du plan corporel chez le poulet et la souris	186
154	5.1 La polarité antéro-postérieure du blastoderme de	100
	poulet est associée à la ligne primitive	186
	5.2 La séparation des lignées cellulaires de	
154	l'embryon et des structures extra-embryonnaires s'effectue lors des stades précoces du développement chez la souris	188
157	5.3 Le mouvement de l'endoderme viscéral antérieur	100
157	indique l'axe antéro-postérieur définitif de l'embryon de souris	192
	5.4 Les cartes des territoires présomptifs des embryons	
158	de vertébrés se présentent comme des variations d'un même plan de base	193
	Encart 5A Régulation fine du signal Nodal	194
159	5.5 L'induction mésodermique et la mise en place du plan	
160	d'organisation chez le poulet et la souris s'effectuent pendant la formation de la ligne primitive	196

5.6 Le nœud qui se développe à l'extrémité antérieure de la ligne primitive chez le poulet et la souris est équivalent à l'organisateur de Spemann chez le xénope	198
5.7 Cinduction neurale chez le poulet et la souris est initiee par un signal FGF suivi d'une inhibition du signal BMP dans un second temps	200
Encart 5B Complexes de remodelage chromatinien	202
5.8 Les structures axiales de poulet et de souris sont générées à partir d'un auto-renouvellement de populations cellulaires	203
Résumé	205
Encart 5C L'acide rétinoïque : une petite molécule signal intercellulaire	206
Formation des somites et organisation antéro-postérieure	207
5.9 Les somites sont formés selon un ordre bien défini le long de l'axe antéro-postérieur	208
Encart 5D La voie de signalisation Notch	212
5.10 L'identité des somites le long de l'axe antéro- postérieur est spécifiée par l'expression des gènes Hox	213
Encart 5E Les gènes Hox	215
5.11 La délétion ou la surexpression de gènes Hox entraîne des modifications dans la mise en place du patron axial	218
5.12 L'expression des gènes Hox est activée selon une orientation antéro-postérieure	219
5.13 Le devenir des cellules des somites est déterminé par des signaux provenant de tissus voisins	220
Résumé	222
Origine des crêtes neurales et leurs devenirs respectifs	223
5.14 Les cellules des crêtes neurales sont issues des bords de la plaque neurale et après avoir migré sont à l'origine d'une grande variété de types cellulaires	223
5.15 Les cellules des crêtes neurales migrent à partir du cerveau postérieur pour coloniser les arcs branchiaux.	224
Résumé	225
Détermination de l'asymétrie gauche-droite	226
5.16 La symétrie bilatérale des jeunes embryons disparaît avec la mise en place de l'asymétrie gauche-droite	
des organes internes.	226
5.17 La rupture de la symétrie droite-gauche peut être initiée dans les cellules du jeune embryon	228
Résumé	229
Résumé du Chapitre 5	229
Chapitre 6 Développement des nématodes et des oursins	235
Nématodes	236
 Encart 6A Les voies apoptotiques chez les nématodes, la drosophile et les mammifères 	238
6.1 Le lignage cellulaire de <i>Caenorhabditis elegans</i> est en grande partie invariant.	239
6.2 L'axe antéro-postérieur de <i>Caenorhabditis elegans</i> est	255
déterminé par des divisions asymétriques	239

Encart 6B Extinction génique par des ARN anti-sens et interférence à ARN	241
6.3 L'axe dorso-ventral est déterminé chez <i>Caenorhabditis elegans</i> par des interactions intercellulaires	242
6.4 Des divisions asymétriques et des interactions entre	
les cellules spécifient les destinées cellulaires dans les embryons précoces de nématode	244
6.5 La différenciation cellulaire chez le nématode est étroitement liée au patron des divisions cellulaires	246
6.6 Les gènes Hox spécifient les identités de position le long de l'axe antéro-postérieur chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	247
6.7 La chronologie des événements marquant le développement du nématode est sous un contrôle génétique qui implique des microARN	248
Encart 6C Extinction génique par des microARN	250
6.8 Le développement de la vulve est initié par l'induction d'un petit nombre de cellules due à des signaux à courte portée émis par une cellule inductrice unique	250
Résumé	253
Échinodermes	254
6.9 Le développement embryonnaire de l'oursin donne naissance à une larve nageuse	254
6.10 L'œuf de l'oursin est polarisé suivant l'axe animal-végétatif	255
6.11 La carte des territoires présomptifs de l'oursin est finement spécifiée, mais l'embryon possède néanmoins un fort pouvoir de régulation embryonnaire	257
6.12 La région végétative de l'embryon d'oursin agit comme un centre organisateur	258
6.13 La région végétative de l'embryon d'oursin est caractérisée par une accumulation nucléaire de β-caténine	259
6.14 Les axes animal-végétatif et oral-aboral de l'oursin correspondent aux axes antéro-postérieur et dorso-ventral des autres deutérostomiens	260
6.15 Le squelette de la larve pluteus se forme à partir du mésenchyme primaire	261
6.16 L'axe oral-aboral de l'embryon d'oursin est relié au plan de la première division de segmentation	263
6.17 L'ectoderme oral agit comme un centre organisateur	264
Encart 6D Le réseau de régulation génétique contrôlant la spécification de l'endomésoderme chez l'oursin	265
Résumé	266
Résumé du Chapitre 6	266
Chapitre 7 Développement des plantes	272
de vie court et un petit génome diploïde	274
Développement embryonnaire	275
7.2 Le développement embryonnaire des plantes passe par différents stades	275
Encart 7A L'embryogenèse chez les angiospermes	276
7.3 Des gradients d'auxine établissent l'axe apico-basal de l'embryon	278

7.4 Les cellules somatiques de la plante peuvent donner	200
Encort 7P. Plontos transgéniques	200
75 L'expansion cellulaire est un processus maieur dans	201
la croissance des plantes et leur morphogenèse	281
Résumé	282
Méristèmes	283
7.6 Un méristème contient une petite zone centrale de cellules souches capable de s'auto-renouveler	284
7.7 La taille de l'aire occupée par les cellules souches dans le méristème est maintenue constante par une boucle de rétroaction en direction du centre organisateur	284
7.8 Le devenir des cellules des différentes couches du méristème peut être modifié en changeant leur position	285
7.9 La carte des territoires présomptifs du méristème apical caulinaire embryonnaire peut être construite par analyse	202
clonale	287
7.10 Le développement du méristème est dépendant de signaux issus d'autres parties de la plante	288
7.11 L'activité de gènes configure les axes proximo-distal et adaxial-abaxial des feuilles issues	200
du mensteme apical	285
générée par un transport régulé d'auxine	290
7.13 Les tissus racinaires sont produits par les méristèmes apicaux racinaires d' <i>Arabidopsis</i> grâce à un ensemble de divisions cellulaires très stéréotypées	292
7.14 Les poils absorbants sont spécifiés par une combinaison d'informations de position et d'inhibition latérale	294
Résumé	294
Le développement floral et le contrôle de la floraison	295
7.15 Des gènes homéotiques contrôlent l'identité des organes dans la fleur	296
Encart 7C Le modèle de base de la mise en place de l'organisation de la fleur d'Arabidopsis	298
7.16 La fleur d'Antirrhinum présente une organisation dorso-ventrale et radiaire	299
7.17 La couche interne du méristème peut spécifier la mise en place du méristème floral	300
7.18 La transition du méristème caulinaire de l'état végétatif à l'état floral est sous contrôle génétique et environnemental	300
7.19 La plupart des plantes à fleurs sont hermaphrodites	500
mais certaines produisent des fleurs unisexuées	302
Résumé	303
Résumé du chapitre 7	304
Chapitre 8 Différenciation cellulaire et cellules	200
Le contrôle de l'expression des gènes	312
	275

Le contrôle de l'expression des gènes

8.1 Le contrôle de la transcription implique des régulateurs transcriptionnels généraux et tissu-spécifiques

280 281	8.2 L'expression des gènes est aussi contrôlée par des modifications chimiques et structurales de l'ADN et des protéines histones, qui modifient la structure de la chromatine	316
281	Encart 8A Contrôle épigénétique de l'expression génique par des modifications de la chromatine	317
282 283	8.3 Les profils d'activité génique peuvent être transmis grâce à la persistance de protéines régulatrices ou par le maintien des modifications de la chromatine	318
284	8.4 Des signaux extracellulaires peuvent déclencher les changements de profils d'activité génique lors de la différenciation	319
	Résumé	321
284	Modèles de différenciation cellulaire et cellules souches	322
205	8.5 La différenciation musculaire est déterminée par la famille de facteurs de transcription MyoD	322
205	 8.6 La differenciation musculaire implique une sortie du cycle cellulaire mais est réversible 8.7 Toutes les cellules sanguines dérivent de cellules 	324
287	souches multipotentes	325
288	8.8 Des facteurs intrinsèques et extrinsèques contrôlent la différenciation des lignées hématopoïétiques	328
289	8.9 C'expression du gene de la globine au cours du développement est contrôlée par des séquences régulatrices très éloignées des régions codantes	330
290	8.10 L'épiderme de la peau des mammifères adultes est continuellement remplacé par des cellules issues de cellules souches	332
202	8.11 Les cellules souches utilisent différentes modalités de division pour entretenir les tissus	334
292	8.12 Le revêtement intestinal : un autre exemple d'épithélium à renouvellement continu	336
294	8.13 Les cellules musculaires squelettiques et les cellules	
294	souches chez l'adulte.	338
295 296	8.14 Les cellules souches embryonnaires prolifèrent, peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires en culture et contribuent au développement normal <i>in vivo</i>	339
298	Encart 8B L'isolement et la culture de cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES)	341
	Résumé	342
299	La plasticité de l'état différencié	343
300	8.15 Les noyaux de cellules différenciées peuvent orchestrer un développement	344
300	8.16 Le profil d'activité génique des cellules différenciées peut être modifié par fusion cellulaire	346
300	8.17 L'état différencié d'une cellule peut changer par transdifférenciation	346
302	8.18 Les cellules souches pourraient être une clé de la médecine régénérative	348
304	Encart 8C Ingénierie tissulaire et cellules souches	349
501	Encart 8D Les cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS)	350
309	8.19 Des approches variées permettent d'obtenir des	
312	cellules différenciées utilisables en thérapie cellulaire	352
	Résumé	355
313	Résumé du Chapitre 8	355

Chapitre 9 La morphogenèse : modification de formes dans l'embryon Adhérence cellulaire 9 1 La réagrégation de cellules dissociées démontre l'existence

361

363

d'une adhésivité différentielle entre tissus distincts	363
Encart 9A Molécules d'adhérence cellulaire et jonctions cellulaires	365
9.2 Les cadhérines permettent une adhésivité sélective	366
9.3 La conversion d'un tissu épithélial en tissu mésenchymateux (et <i>vice versa</i>) implique des modifications de l'adhérence cellulaire	367
Encart 9B Cytosquelette, modification de forme et mouvement cellulaire	368
Résumé	369
Clivage et formation de la blastula	369
9.4 L'orientation du fuseau mitotique détermine l'orientation du plan de division	370
9.5 La position du fuseau dans la cellule détermine les tailles relatives des cellules filles	372
9.6 La polarité cellulaire apparaît dans la blastula d'amphibien et dans la morula de souris	373
9.7 Les jonctions serrées et un transport d'ions permettent une accumulation de liquide à l'origine de la formation	225
	3/5
	ס/כ דדר
 9.8 La gastrulation chez l'oursin implique une transition épithélio-mésenchymateuse, des migrations cellulaires et une invagination de la paroi de la blastula 	377
9.9 L'invagination du mésoderme de la drosophile est provoquée par des modifications de morphologie cellulaire contrôlées par des gènes de polarité dorso-ventrale	380
9.10 L'extension de la bandelette germinative de drosophile implique un remodelage myosine-dépendant des jonctions cellulaires et une intercalation cellulaire	382
9.11 La gastrulation des amphibiens et des poissons implique involution, épibolie et extension convergente	383
Encart 9C L'extension convergente	385
9.12 Le développement de la chorde chez le xénope illustre la nécessité d'une polarité antéro-postérieure pré-établie pour la mise en place d'une polarité cellulaire médio-latérale	387
9.13 La gastrulation de l'embryon de poulet et de souris implique la délamination de cellules de l'épiblaste et leur immigration au niveau de la ligne primitive	389
Résumé	391
La formation du tube neural	392
9.14 La formation du tube neural est due à des changements de forme cellulaire et à une extension convergente	393
Encart 9D Les récepteurs Eph et leurs ligands éphrine	395
Encart 9E Les malformations du tube neural	396
Résumé	396

Migration cellulaire 397 9.15 Les cellules des crêtes neurales se différencient en une large gamme de types cellulaires différents 397 9.16 La migration des cellules des crêtes neurales est contrôlée par des signaux environnementaux 397 **9.17** La mise en place de l'ébauche de la ligne latérale des poissons est un exemple de migration cellulaire collective 399 9.18 Les fermetures dorsale chez l'embryon de drosophile et ventrale chez celui de Caenorhabditis elegans se réalisent 400 par l'entremise de filopodes Résumé 401 **Dilatation dirigée** 402 9.19 L'extension tardive et la rigidification de la chorde sont obtenues par dilatation dirigée 402 9.20 La contraction circonférentielle des cellules hypodermiques allonge l'embryon de nématode 402 Résumé 403 Résumé du Chapitre 9 403 Chapitre 10 Cellules germinales, fécondation, et déterminisme du sexe 409 La différenciation des cellules germinales 410 **10.1** Les cellules germinales sont spécifiées chez certains embryons par la présence d'un plasme germinal dans l'ovule 411 10.2 Chez les mammifères, les cellules germinales sont induites par des interactions intercellulaires au cours du développement 413 **10.3** Les cellules germinales migrent depuis leur site d'origine jusqu'aux gonades 414 10.4 Les cellules germinales sont guidées vers leur 415 destination finale par des signaux chimiques **10.5** La différenciation des cellules germinales implique une réduction de moitié du nombre de chromosomes par la méiose 416 417 Encart 10A Globules polaires **10.6** Le développement d'un ovocyte peut impliquer une amplification génique et des apports de la part d'autres cellules 419 **10.7** Des facteurs cytoplasmiques sont responsables du maintien des potentialités ovocytaires 420 10.8 Chez les mammifères certains gènes contrôlant 420 la croissance embryonnaire sont sous « empreinte » Résumé 423 Fécondation 424 10.9 La fécondation fait intervenir des interactions de 424 surface entre les gamètes **10.10** Des modifications de la membrane plasmique et des enveloppes de l'ovule bloquent la polyspermie lors de la fécondation 426 10.11 La fusion ovule-spermatozoïde provogue une onde calcique à l'origine de l'activation de l'œuf 427 Résumé 429 430 Détermination du phénotype sexuel

10.12 Le principal gène de détermination du sexe est sur	470
le chromosome Y chez les mammifères 10 13 : Le phénotype sexuel des mammifères est régulé par	430
des hormones gonadiques	431
10.14 La détermination du sexe a pour premier signal le	
nombre de chromosomes X chez la drosophile et est autonome au niveau cellulaire	433
10.15 Le développement sexuel somatique chez	
<i>Caenorhabditis</i> est déterminé par le nombre de chromosomes X	435
10.16 La détermination sexuelle des cellules germinales dépend de la constitution génétique et de signaux intercellulaires	436
10.17 Des stratégies variées sont utilisées pour la	150
compensation de dose des gènes liés au chromosome X	438
Résumé	440
Résumé du Chapitre 10	441
Chapitre 11 Organogenèse	446
Le membre des vertébrés	447
11.1 Le membre des vertébrés se forme à partir d'un	
bourgeon de membre	447
définies par l'activité de gènes exprimés dans le mésoderme	
des lames latérales	449
11.3 La crête apicale ectodermique est requise pour la creies po	
le long de son axe proximal-distal	451
11.4 La croissance du bourgeon de membre fait appel à des comportements cellulaires orientés	452
11.5 La mise en place de l'organisation du bourgeon de	
membre fait appel à de l'information de position	454
bourgeon de membre est spécifiée reste une question ouverte	454
11.7 La zone à activité polarisante spécifie les positions le	
long de l'axe antéro-postérieur du membre	456
Encart 11A Les effets des tératogènes sur le développement embryonnaire	458
Encart 11B Information de position et gradients de	
morphogènes	460
11.8 Sonic hedgehog est le morphogène produit par la zone à activité polarisante	161
11.9 La manière dont l'identité des doigts est codée n'est pas	401
connue	462
Encart 11C Des mutations qui affectent la formation de l'axe antéro-postérieur du membre peuvent causer des polydactylies	463
11.10 La mise en place de l'axe dorso-ventral du membre est	
contrôlée par l'ectoderme	464
entre les centres de signalisation	465
Encart 11D La signalisation Sonic hedgehog et le cil primaire	466
11.12 Des interprétations différentes de signaux de position identiques donnent naissance à des membres différents	467
11.13 Les gènes Hox interviennent à de multiples reprises	466
uans le developpement des membres 11.14 L'auto-organisation pourrait être impliquée dans le	468
développement du bourgeon de membre	471
Encart 11E Les mécanismes de réaction-diffusion	472

11.15 L'organisation de la musculature du membre est	
contrôlée par le tissu conjonctif	473
11.16 Le développement initial des cartilages, des muscles et des tendons est autonome	473
11.17 La formation des articulations nécessite des	
signaux sécrétés et des stimuli mécaniques	474
11.18 La séparation des doigts résulte de morts cellulaires programmées	475
Résumé	476
Les pattes et les ailes des insectes	476
11.19 L'aile adulte émerge pendant la métamorphose après l'enroulement et l'évagination du disque imaginal d'aile	477
11.20 Un centre de signalisation situé à la frontière entre les compartiments antérieurs et postérieurs organise le développement de l'aile de la drosophile selon l'axe antéro-	
postérieur	478
11.21 Un centre de signalisation situé à la frontière entre les compartiments dorsaux et ventraux organise le développement de l'aile de la drosophile selon l'axe dorso-ventral	481
11.22 Le gène <i>vestigial</i> spécifie l'identité des ailes et	
contrôle leur croissance	481
11.23 Comment l'organisation de l'aile le long de l'axe	
proximo-distal est-elle établie reste une question ouverte	483
manière similaire à celui du disque d'aile, sauf en ce qui concerne l'axe proximo-distal	483
11.25 Les motifs colorés des papillons se forment grâce à	
des informations positionnelles supplémentaires	485
11.26 Différents disques imaginaux peuvent avoir les mêmes valeurs de position	486
Résumé	488
Les yeux des vertébrés et des insectes	489
11.27 L'œil des vertébrés se développe essentiellement à partir du tube neural et de l'ectoderme de la tête	490
11.28 La mise en place de l'organisation de l'œil chez la	
drosophile repose sur des interactions cellule-cellule	494
Résumé	497
Les poumons des vertébrés et le système trachéen	
des insectes	498
11.29 Les poumons de vertébrés se développent par ramification de tubes épithéliaux	499
type de morphogenèse ramifiée	500
Résumé	502
Los vaissoaux sanguins et le sour des vertébrés	502
11 31 Le système sanguin se développe par vasculogenèse	202
à laquelle succède une angiogenèse	502
11.32 Le développement du cœur des vertébrés implique la	
morphogenèse et la régionalisation d'un tube mésodermique	504
Les dents	507
11.33 Le développement dentaire implique des interactions épithélio-mésenchymateuses et un code de gènes à	
homéoboîte spécifie l'identité dentaire	507
Résumé	510
Résumé du Chapitre 11	510

Chapitre 12 Développement du système nerveux	520		
Spécification de l'identité cellulaire dans le système nerveux	522		
12.1 La régionalisation initiale du cerveau des vertébrés implique des signaux d'organisateurs locaux	522		
12.2 Les centres de signalisation locaux façonnent le cerveau le long de l'axe antéro-postérieur	523		
12.3 Le cortex cérébral est façonné par des signaux de la			
crête neurale antérieure	524		
12.4 Le rhombencéphale est segmenté en rhombomères par des limites de restriction de lignage cellulaire	525		
12.5 Les gènes Hox fournissent une information de position dans le rhombencéphale en développement	527		
12.6 Le patron de différenciation cellulaire le long de l'axe			
dorso-ventral de la moelle épinière dépend de signaux			
ventraux et dorsaux	528		
12.7 Les sous-types neuronaux de la moelle épinière ventrale sont spécifiés par le gradient ventro-dorsal de Shh	530		
12.8 Des motoneurones spinaux avec des positions			
dorso-ventrales distinctes innervent des muscles differents du trops et des membres	521		
12 9. Des signaux sécrétés à partir du nœud de Hensen et du	221		
mésoderne adjacent déterminent le patron antéro-postérieur			
de la moelle épinière	532		
Résumé	533		
Formation et migration des neurones	533		
12.10 Chez la drosophile les neurones sont formés à partir des amas proneuraux	533		
12.11 Le développement des neurones chez la drosophile			
implique des divisions cellulaires asymétriques et des changements dans le temps de l'expression des gènes	536		
Encart 12A Spécification des organes sensoriels de la Drosophile adulte	537		
12.12 La production des neurones chez les vertébrés implique, comme pour la drosophile, une inhibition latérale	538		
12.13 Les neurones sont formés dans la zone proliférative du tube neural des vertébrés et migrent vers l'extérieur	539		
Speart 128 Chronologio de la paiscance des neurones	555		
corticaux	541		
12.14 De nombreux interneurones corticaux migrent			
tangentiellement	543		
Résumé	543		
Navigation axonale	544		
12.15 Le cône de croissance contrôle le trajet suivi par l'axone en cours de croissance	545		
Encart 12C Développement du circuit neuronal dans le			
réflexe rotulien	547		
12.16 Les axones des motoneurones du membre de poulet			
sont guidés par des interactions éphrines- Eph	548		
12.17 Les axones franchissant la ligne médiane sont à la fois attirés et repoussés			
12.18 Les neurones de la rétine établissent des connexions			
ordonnées avec les centres visuels du cerveau	550		
Résumé	553		
Formation et raffinement des synapses	554		

12.19 La formation des synapses repose sur des interactions	556
	550
qui implique un dysfonctionnement synaptique	558
12.20 Beaucoup de motoneurones meurent au cours d'un développement normal	559
12.21 La mort et la survie des neurones impliquent à la fois des facteurs intrinsèques et extrinsèques	559
12.22 Les projections rétinotopiques du cerveau sont affinées par l'activité neuronale	560
Résumé	561
Résumé du Chapitre 12	562
Chapitre 13 Croissance, développement post-	
embryonnaire et régénération	569
Croissance	570
13.1 Les tissus croissent par prolifération cellulaire,	
agrandissement des cellules, ou accrétion	571
13.2 La prolifération cellulaire est contrôlée par la régulation de l'entrée dans le cycle cellulaire	572
13.3 Les divisions cellulaires au cours du développement	
précoce peuvent être contrôlées par un programme de développement intrinsèque	573
13.4 Des signaux extrinsèques coordonnent	
les divisions cellulaires, la croissance cellulaire et	
de l'aile de la drosophile	574
Encart 130 Los éléments essentiels de la veie de	
signalisation Hinno chez la drosonhile et les mammifères	575
13.5 Les cancers peuvent être provoqués par des mutations	575
de gènes contrôlant la prolifération cellulaire	576
13.6 Les mécanismes de contrôle de la taille peuvent être	
différents d'un organe à l'autre	578
13.7 La taille globale du corps dépend de l'intensité et de	
la durée de la croissance	580
13.8 Des hormones et des facteurs de croissance	
coordonnent la croissance des tissus et des organes,	501
	101
encart 138 Le determinant principal de la talle du corps	582
13.9 L'élongation des os longs est contrôlée par la	202
combinaison d'un programme intrinsèque de croissance et	
de facteurs extracellulaires	583
Encart 13C Le rapport entre la longueur des doigts est	
déterminé lors du développement embryonnaire	586
13.10 La quantité de nourriture reçue par un embryon peut	
avoir des effets importants à très long terme	587
Résumé	588
Mue et métamorphose	588
13.11 Les arthropodes doivent muer pour pouvoir croître	589
13.12 La taille du corps des insectes est déterminée par la	
vitesse et la durée de la croissance larvaire	589
13.13 La métamorphose des amphibiens est sous contrôle	
hormonal	592
Résumé	593

Régénération	593	14.3 Les complexes de gènes Hox ont évolué par
13.14 Il existe deux types de régénération, la morphallaxie	FOF	duplications géniques
13 15 La régénération des nattes chez les amphibiens et les	נפנ	cibles contribuent à la diversification des plans d'organisation
insectes implique l'épimorphose	595	des bilatériens
Encart 13D Régénération de l'hydre	596	14.5 Des différences d'expression des gènes Hox
13.16 La régénération de la patte d'amphibien implique une		d'appendices chez les arthropodes
dédifférenciation cellulaire et une nouvelle croissance	597	14.6 Le plan d'organisation de base des arthropodes et
Encart 13E Régénération des planaires	598	des vertébrés est similaire, mais l'axe dorso-ventral est inversé
13.17 La régéneration des pattes chez les amphibiens dépend de la présence de nerfs	602	14.7 Les membres des tétrapodes ont évolué à partir des nageoires
13.18 Le blastème donne naissance à des structures		14.8 Les membres ont évolué pour exercer différentes
d'amputation	603	fonctions spécialisées
13.19 L'acide rétinoïque peut modifier les valeurs de		Encart 14B L'évolution des ailes des oiseaux
position proximo-distales dans des membres en cours de		Encart 14C La réduction des structures pelviennes chez
régénération	605	régulatrice d'un gène
digitales	607	14.9 L'évolution adaptative au sein d'une même espèce
13.21 Les pattes des insectes intercalent des valeurs de		permet d'étudier les modifications du développement à la
position à la fois par des croissances proximo-distale et	607	14 10 L'évolution de différents types d'yeux dans différents
13 22 La régénération du cœur du poisson-zèbre implique	007	groupes d'animaux est un exemple d'évolution parallèle
la reprise des divisions des cardiomyocytes	609	utilisant un circuit génétique ancien
Encart 13F Pourquoi ne peut-on pas régénérer nos membres ?	611	14.11 Des structures embryonnaires ont acquis de nouvelles fonctions au cours de l'évolution
Résumé	612	Résumé
Vieillissement et sénescence	613	Changements dans la durée, la vitesse et la chronologie
13.23 Les gènes peuvent modifier le déroulement de	612	des processus de développement
la senescence	613 615	14.12 Des modifications de la croissance peuvent modifier
	01J	le plan d'organisation du corps
Resume	010	14.13 L'evolution peut etre due a des changements de vitesse, de durée et de chronologie des processus de
Resume ou Chapitre 13	611	développement
Chapitre 14 Évolution et développement	623	14.14 L'évolution des cycles vitaux a des implications pour le développement
Encart 14A Les pinsons de Darwin	625	Pásumá
L'évolution du développement	626	Résumé du Chapitre 14
14.1 Des études génomiques nous éclairent sur l'origine des métazoaires	626	Resulte du Chapitre 14
14.2 Les animaux ont évolué à partir d'ancêtres unicellulaires	628	Glossaire
Résumé	629	index
Les modifications évolutives du développement		
embryonnaire	629	

Liste des encarts

Encarts généraux

Encart 1A Étapes fondamentales du développement	
de Xenopus laevis	4
Encart 2I Polarité planaire chez la drosophile	88
Encart 5E Les gènes Hox	215
Encart 6C Extinction génique par des microARN	250
Encart 7A L'embryogenèse chez les angiospermes	276
Encart 7C Le modèle de base de la mise en place de	
l'organisation de la fleur d'Arabidopsis	298
Encart 9C L'extension convergente	385
Encart 10A Globules polaires	417
Encart 11B Information de position et gradients de	
morphogènes	460
Encart 11E Les mécanismes de réaction-diffusion	472
Encart 12A Spécification des organes sensoriels de la Drosophile	
adulte	537
Encart 12C Développement du circuit neuronal dans le	
réflexe rotulien	547
Encart 13B Le déterminant principal de la taille du corps	
des chiens est l'axe Hormone de croissance-IGF-1	582
Encart 13C Le rapport entre la longueur des doigts est	
déterminé lors du développement embryonnaire	586
Encart 13D Régénération de l'hydre	596
Encart 13E Régénération des planaires	598
Encart 13F Pourquoi ne peut-on pas régénérer nos membres ?	611
Encart 14A Les pinsons de Darwin	625
Encart 14B L'évolution des ailes des oiseaux	642
Encarts de biologie cellulaire	
Encart 1B Le cycle cellulaire de la mitose	7
Encart 1C Feuillets embryonnaires	15
Encart 1E Transduction du signal et voies de signalisation	
intracellulaires	26
Encart 2B La voie de signalisation Toll : une voie multifonctionelle	e 54
Encart 2C La voie de signalisation JAK–STAT	57
Encart 2F La voie de signalisation Hedgehog	82
Encart 4A Signaux protéiques intercellulaires dans le	
développement des vertébrés	147
Encart 4B La voie de signalisation Wnt/β-caténine	148
Encart 4C Voie de signalisation de membres de la famille des	
facteurs de croissance TGF-ß	157
Encart 4E La voie de signalisation FGF	165
Encart 5A Régulation fine du signal Nodal	194
Encart 5B Complexes de remodelage chromatinien	202
Encart 50 L'acide rétinoïque : une netite molécule signal	202
intercellulaire	206
Encart 5D La voie de signalisation Notch	200
Literit DD La voie de signalisation noten	212

Encart 6A Les voies apoptotiques chez les nématodes,	
la drosophile et les mammifères	238
Encart 8A Contrôle épigénétique de l'expression génique	
par des modifications de la chromatine	317
Encart 9A Molécules d'adhérence cellulaire et jonctions	
cellulaires	365
Encart 9B Cytosquelette, modification de forme	
et mouvement cellulaire	368
Encart 9D Les récepteurs Eph et leurs ligands éphrine	395
Encart 11D La signalisation Sonic hedgehog et le cil primaire	466
Encart 13A Les éléments essentiels de la voie de	
signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères	575
Encarts expérimentaux	
Encart 1D Observer l'expression des gènes chez l'embryon	20
Encart 2A Mutagenèse et stratégie de criblage génétique pour	
identifier des mutants de développement chez la drosophile	43
Encart 2D Transgénèse s'effectuant par l'intermédiaire	
de l'élément P	69
Encart 2E Expression de gènes cibles et dépistage	
de défauts d'expression	70
Encart 2G Les mutants affectant l'organisation des denticules	
donnent des informations sur l'organisation des segments	84
Encart 2H Mosaïques génétiques et recombinaison mitotique	86
Encart 3B Profils d'expression génique par puces à ADN et	
séquençage d'ARN	128
Encart 3C Criblages de mutagenèse à large échelle	
pour des mutations recessives chez le poisson-zebre	134
Encart 3D Le système Cre/loxP : une stratègie pour	120
Invaluer des genes chez la souris	158
Encart 4D Etude de la fonction d'un recepteur par	161
Encart (P. Extinction génique par des APN anti-cons	101
et interférence à ARN	241
Encart 6D. Le réseau de régulation génétique contrôlant la	241
spécification de l'endomésoderme chez l'oursin	265
Encart 7B Plantes transgéniques	281
Encart 8B L'isolement et la culture de cellules souches	201
embryonnaires de souris (cellules ES)	341
Encart 8D Les cellules souches pluripotentes induites	
(cellules iPS)	350
Encart 12B Chronologie de la naissance des neurones corticaux	541
Encart 14C La réduction des structures pelviennes chez les	
épinoches est due à des mutations dans la région régulatrice	
d'un gène	644

Encarts médicaux

Encart 1F Quand le développement est défectueux

- Encart 3A Diagnostic génétique pré-implantatoire
- Encart 8C Ingénierie tissulaire et cellules souches
- Encart 9E Les malformations du tube neural

Encart 11A Les effets des tératogènes sur le développement embryonnaire

- 126 Encart 11C Des mutations qui affectent la formation de l'axe antéro-
- 349postérieur du membre peuvent causer des polydactylies463
- 396 Encart 12D L'autisme : un trouble du développement
 - qui implique un dysfonctionnement synaptique 558
- 458

Avant-propos

Comme nous l'avions souligné dans l'avant-propos de notre quatrième édition de Principles of Development, la biologie du développement est au centre de toute la biologie des organismes pluricellulaires. Elle traite des processus par lesquels les gènes d'un œuf fécondé, en contrôlant le comportement cellulaire de l'embryon, déterminent les caractéristiques de l'animal ou de la plante. Un lien majeur unit également la biologie du développement à l'évolution, puisque les organismes qui s'adaptent le mieux à leur environnement sont issus de changements ayant affecté le développement. Les quatre années écoulées depuis la dernière édition ont vu une progression constante dans la compréhension des bases cellulaires et moléculaires du développement embryonnaire, avec l'essor en parallèle de la génomique. Dans cette cinquième édition, nous avons inclus beaucoup de ces avancées récentes. Il est à noter tout particulièrement les progrès qui se sont manifestés concernant notre compréhension de la différenciation cellulaire (Chapitre 8) et le décryptage des modifications affectant l'évolution (Chapitre 14). À travers cette nouvelle édition, nous avons aussi essayé de rendre compte de l'importance croissante de la biologie du développement dans le domaine médical, notamment en génétique clinique et en médecine régénérative (Chapitre 8).

Principles of Development, destiné à des étudiants, a pour but de leur permettre de comprendre les principes qui président au développement. Nous avons essayé de rendre ces principes aussi clairs que possible et de fournir de nombreux résumés à la fois sous des formes rédigées et illustrées. Nous avons concentré notre attention plus spécialement sur les systèmes qui illustrent le mieux les principes du développement, plutôt que de tenter de présenter une vue exhaustive sur le sujet. Nous avons aussi essayé d'éviter de trop entrer dans les détails qui, donnés en grand nombre, auraient pu occulter les principes généraux. Les détails peuvent être retrouvés dans beaucoup de revues de la littérature scientifique qui sont régulièrement mises à jour. Nous croyons que les détails sont soumis à changements alors que les principes demeurent, et plus nous comprendrons ces derniers, plus il nous sera possible de faire un livre court !

Nous avons estimé que les étudiants possédaient les notions de bases en biologie cellulaire et moléculaire ainsi qu'en génétique, cependant tous les concepts clés, tels que ceux relatifs au contrôle de l'activité génique sont expliqués dans le texte. Le glossaire détaillé permet à cet ouvrage de se suffire à lui-même. Les illustrations constituent des données particulières et ont été soigneusement définies et sélectionnées afin d'illustrer autant des expériences que des mécanismes. Beaucoup de nouveaux schémas et photographies ont été introduits dans l'ensemble de l'ouvrage, avec l'indication de leur provenance. En fournissant davantage de références bibliographiques, notre souci a été de guider l'étudiant vers des articles et revues pouvant les aider, plutôt que de citer tous les scientifiques qui ont apporté des contributions majeures : que ceux que nous n'avons pas cités nous pardonnent. Comme dans les éditions précédentes, nous avons concentré notre attention sur les vertébrés et la drosophile, mais nous avons inclus d'autres organismes tels que le nématode et l'oursin quand ils s'avèrent les plus pertinents pour illustrer un concept. Comme dans l'édition précédente, l'ouvrage considère tout d'abord les processus qui président à la mise en place du plan d'organisation générale chez la drosophile (Chapitre 2), et ceci en raison du rôle central que la drosophile a joué, et joue encore, dans la compréhension des mécanismes du développement.

Le Chapitre 3 décrit l'embryologie et la génétique d'organismes modèles de vertébrés en même temps que les principales méthodes utilisées pour les étudier. Une approche du développement embryonnaire humain a été incluse dans cette édition, car la comparaison de ce dernier, quand cela est possible, avec le développement d'autres vertébrés, peut avoir un intérêt dans la perspective d'applications médicales. Les mécanismes impliqués dans la mise en place du patron de nos organismes modèles de vertébrés lors de leur développement précoce font ensuite l'objet des deux chapitres suivants (Chapitres 4 et 5). Ceux-ci ont été réorganisés de manière à ce que le processus qui fixe le plan corporel précoce soit tout d'abord décrit dans sa totalité chez le xénope (Chapitre 4), le vertébré chez lequel les principes généraux ont été découverts, avant d'être comparé à celui du poisson-zèbre (Chapitre 4) et à ceux du poulet et de la souris (Chapitre 5). Le Chapitre 5 considère aussi comment s'achève l'organisation corporelle, avec principalement des compléments concernant le poulet et la souris. Le chapitre 6 est maintenant focalisé sur la mise en place du patron chez deux organismes modèles d'invertébrés, le nématode et l'oursin. Le Chapitre 7 concerne le développement des plantes, qui est souvent négligé dans les ouvrages généraux de biologie du développement, et qui possède une importance à part entière. Les chapitres 8 et 9 sont centrés sur les processus fondamentaux de la différenciation et de la morphogenèse et ont été largement révisés, en particulier en ce qui concerne les cellules souches dans le Chapitre 8. Le Chapitre 10 traite des cellules germinales et de la fécondation. L'organogenèse (Chapitre 11) et le développement du système nerveux (Chapitre 12) sont de vastes sujets, qui ont nécessité de notre part des choix très sélectifs, mais nous avons inclus de nouveaux encarts mettant en avant des exemples démonstratifs d'intérêt médical. Dans cette édition, la croissance et la régénération sont considérées ensemble dans un même chapitre (Chapitre 13) qui a été réorganisé, et le dernier chapitre (Chapitre 14) traite du développement en lien avec l'évolution.

Pour cette nouvelle édition, Alfonso Martinez Arias a rejoint Cheryll Tickle et Lewis Wolpert en tant que co-auteur principal, et Andrew Lumsden est devenu auteur. Chaque chapitre a aussi été revu par de nombreux experts (voir page xxii) auxquels nous formulons nos remerciements. Les auteurs ont fait les révisions initiales, qui ont été ensuite déchiffrées, puis mises au point et incorporées par notre éditrice, Eleanor Lawrence. Son implication a été essentielle dans la préparation de cette édition et son expertise a imprégné l'ouvrage. L'intervention d'Eleanor a aussi été précieuse pour s'assurer que les informations contenues dans ce livre étaient facilement accessibles aux étudiants. Les nouvelles illustrations ont été brillamment réalisées ou adaptées par Matthew McClements, qui avait créé les illustrations de la première édition.

Nous sommes reconnaissants envers Alice Roberts et Jonathan Crowe de Oxford University Press pour leur aide et leur patience tout au long de la préparation de cette nouvelle édition.

> L. W. Londres Septembre 2014

> C. T. Bath Septembre 2014

A. M. A. Cambridge Septembre 2014

Remerciements

Nous remercions vivement les personnes suivantes qui ont relu les différents chapitres de l'ouvrage : Michael Akam, Université de Cambridge Heather J. Anderson, Université de Winthrop Michael Bate, Université de Cambridge Jeremy Brockes, University College London Marianne Bronner, California Institute of Technology Deborah L. Chapman, Université de Pittsburgh Susan Ernst, Université de Tufts Makoto Furutani-Seiki, Université de Bath Peter Holland, Université d'Oxford Robert Kelsh, Université de Bath Jane P. Kenney-Hunt, Westminster College Tetsu Kudoh, Université de Exeter Fang Ju Lin, Université de Coastal Carolina Philip Maini, Université d'Oxford
Bonny Millimaki, Université de Lipscomb
Tony Perry, Université de Bath
Lisa M. Nagy, Université d'Arizona
Fred Sablitzky, Université de Nottingham
James Sharpe, CRG Barcelone (Espagne)
Rebecca Spokony, Baruch College, the City University de New York
Ajay Srivastava, Université de Western Kentucky
Kate Storey, Université de Dundee
Vasanta Subramanian, Université de Bath
Andrew Ward, Université de Bath
Neil Vargesson, Université d'Aberdeen
Heather Verkade, Université d'East Anglia

Abréviations

ADH : alcool déshydrogénase (Alcohol Dehydrogenase) **ENU** : N-nitroso-N-éthylurée (pour *Ethylnitrosourea*) **ADNc** : ADN complémentaire (*cDNA*) AER : crête apicale ectodermique (pour Apical Ectodermal Ridge) AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique APC : protéine de la polypose adénomateuse du côlon (pour Adenomatous Polyposis Coli) ARF : facteur de réponse à l'auxine (pour Auxin-Responsive Factor) ARNi : interférence à ARN ou ARN interférant (RNAi ou RNA *interference*) **ARNnc** : ARN non codant (*non-coding RNA* ou *ncRNA*) AUX/IAA : auxine (voir IAA) bHLH : hélice-boucle-hélice basique (pour basic Helix-Loop-Helix) BMP : protéine morphogénétique osseuse (pour Bone Morphogenetic Protein) CAM : molécule d'adhérence cellulaire (pour Cell Adhesion Hormone) Molecule) Cdk : protéine kinase dépendante d'une cycline (pour Cyclin-dependent kinase) Acid) CGL : Corps Genouillé Latéral (ou LGN pour Lateral Geniculate Nucleus) CGP : Cellule Germinale Primordiale (ou PGC pour Primordial Germinal Cell) ChIP-seq : séquençage de fragments immunoprécipités par immunoprécipitation de la chromatine (pour Chromatin Immunoprecipitation followed by DNA sequencing) **Ci** : protéine Cubitus interruptus Protein) **CiPS cell** : cellule CiPS (pour *Chemically induced iPS cell*) **CK1** : caséine kinase 1 (pour *Casein Kinase 1*) CML : Colonne Motrice Latérale (ou LMC pour Lateral Motor Column) CNA : Crête Neurale Antérieure (ou ANR pour Anterior Neural Ridge) **CRBP** : protéine liant le rétinol cellulaire (pour Cellular Reti*nol-Binding Protein*) **CRH** : corticolibérine (pour *Corticotropin-Releasing Hormone*) **CRISPR** : courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées (pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) CSF : facteur stimulateur de colonies (pour Colony-Stimulating Kinase-3) Factor) DCC : protéine « supprimée dans le cancer colorectal » (pour Deleted in Colorectal Cancer (protein)) **Dhh** : protéine Desert hedgehog Dkk : protéine Dickkopf **Dpp** : protéine Decapentaplegic Dsh : protéine Dishevelled **Dsx** : protéine Doublesex EGF : facteur de croissance épidermique (pour Epidermal *Growth Factor*) EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique (pour Epidermal Growth Factor Receptor)

epiSC : cellule souche épiblastique (pour epiblast Stem Cell) **EPO** : érythropoïétine **ES cell** : cellule souche embryonnaire (pour *Embryonic Stem cell*) **EVA** : Endoderme Viscéral Antérieur EVD : Endoderme Viscéral Distal FGF : facteur de croissance fibroblastique (pour Fibroblast *Growth Factor*) **FGFR** : récepteur du facteur de croissance fibroblastique (pour Fibroblast Growth Factor Receptor) FISH : hybridation in situ fluorescente (pour Fluorescence In Situ *Hybridization*) FIV : Fécondation In Vitro Fmi : protéine Flamingo **FSH** : hormone folliculo-stimulante (pour *Follicle-Stimulating* Fz : protéine Frizzled **GABA** : acide γ-aminobutyrique (pour *Gamma-Aminobutyric* **G-CSF** : facteur de croissance de colonies de granulocytes (pour Granulocyte Colony-Stimulating Factor) **GDF** : facteur de croissance et de différenciation (pour *Growth* Differentiation Factor) GDNF : facteur neurotrophe dérivé de la glie (pour Glial cell *Derived Neurotrophic Factor*) GFP : protéine fluorescente verte (pour Green Fluorescent **GH** : hormone de croissance (pour *Growth Hormone*) **GH-RH** : hormone de libération de l'hormone de croissance ou somatolibérine (pour Growth Hormone-Releasing Hormone) GM-CSF : facteur de croissance de colonies de granulocytes-macrophages (pour Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) **GnRH** : gonadolibérine (pour *Gonadotropin-Releasing Hormone*) GPCR : récepteur couplé aux protéines G (pour G-Protein-*Coupled Receptor*) GRD : Ganglion de la Racine Dorsale (ou DRG pour Dorsal Root Ganglion) **GSK-3** : glycogène synthétase kinase (pour *Glycogen Synthase* IAA : AIA ou acide indole-acétique ou auxine (pour Indole-3-Acetic Acid) IAP : protéine inhibitrice de l'apoptose (pour Inhibitor of Apoptosis Protein) ICSI : micro-injection d'un spermatozoïde dans un ovocyte (pour IntraCytoplasmic Sperm Injection) **IGF-1/2** : facteurs de croissance de type insuline 1/2 (pour Insulin-like Growth Factors 1/2). **Ihh** : protéine Indian hedeghog iPS Cell : cellule souche pluripotente induite (pour induced Pluripotent Stem cell) JAK : protéine kinase Janus (pour Janus Kinase)

JH : hormone juvénile (pour *Juvenile Hormone*) JMR : Jonction Mésencéphale/Rhombencéphale (ou MHB pour *Midbrain-Hindbrain Boundary*)

JNK : protéine kinase N-terminale c-Jun (pour c-Jun N-terminal Kinase)

LCR : région de contrôle du locus (pour *Locus Control Region*) **LEF** : facteur de transcription LEF (pour *Lymphoid Enhancer-binding Factor*)

LH : hormone lutéino-stimulante (pour *Luteinizing Hormone*) **LIF** : facteur inhibiteur de leucémie (pour *Leukemia Inhibitory Factor*)

LRP : protéine liée aux récepteurs de lipoprotéines (pour *Lipoprotein Receptor related Protein*)

MAC : Méristème Apical Caulinaire

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes (pour *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MAPKK : protéine kinase activatrice de la MAPK (pour *MAP Kinase Kinase*)

M-CSF : facteur de croissance de colonies de macrophages (pour *Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

METRO : (région) organisatrice de transport de messages (pour *Message Transport Organizer (region)*)

MF : Méristème Floral

miARN : microARN (*miRNA*)

MPF : facteur promoteur de la maturation (ou de la mitose) (pour *Maturation (Mitosis)-Promoting Factor*)

MRI : imagerie par résonance magnétique (ou IRM pour Magnetic Resonance Imaging)

MuSK : kinase musculaire spécifique (pour *Muscle-Specific Kinase*)

nAG : protéine de gradient antérieur de triton (pour *newt Anterior Gradient (protein)*)

NGF : facteur de croissance nerveuse (pour *Nerve Growth Factor*)

NTD : défaut ou anomalie du tube neural (pour *Neural Tube Defect*)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPT : tomographie par projection optique (pour *Optical Projection Tomography*)

PAR : protéine de partage (pour *Partitioning protein*)

PCP : polarité cellulaire planaire (pour *Planar Cell Polarity*)

PCR : réaction en chaîne par polymérase ou réaction de polymérisation en chaîne (pour *Polymerase Chain Reaction*)

PCT : Période de Croissance Terminale

PHRP : protéine liée à l'hormone parathyroïdienne (pour *Parathyroid-Hormone-Related protein*)

piRNA : petit ARN interagissant avec la protéine Piwi (pour *Piwi-interacting small RNA*)

PKA : protéine kinase dépendante de l'AMPc (pour *Protein Kinase A*)

POS : Précurseur d'Organe Sensoriel (ou **SOP** pour *Sensory Organ Precursor*)

PTTH : hormone prothoracotrope (pour *Prothoracicotropic Hormone*)

RALDH : rétinaldhéhyde déshydrogénase (pour *Retinaldehyde Dehydrogenase*)

RAR : récepteur de l'acide rétinoïque (pour *Retinoic Acid Receptor*)

RB : rétinoblastome (pour *Retinoblastoma*)

RCL : Région de Contrôle du Locus (ou **LCR** pour *Locus Control Region*)

RDH : rétinol déshydrogénase (*Retinol dehydrogenase*) **RiPS cell** : cellule RiPS (pour *RNA-induced iPS cell*)

RISC : complexe silencieux induit par l'ARN (pour *RNA-Induced Silencing Complex*)

RXR : protéine réceptrice d'un rétinoïde X (pour *Retinoid X Receptor*)

SAM : méristème apical de la tige (pour *Shoot Apical Meristem*) **SBB** : Syndrome de Bardet-Beidl

SCF : facteur de croissance des cellules souches (pour *Stem Cell Factor*)

SDF-1 : facteur dérivé des cellules stromales-1 (pour *Stro-mal-cell Derived Factor-1* (ou CXCL12))

Shh : protéine Sonic Hedgehog

Shox : homéoboîte de petite taille (pour *Short stature homeobox*) **SiRNA** : petit ARN interférant ou pARNi (pour *Short interfering RNA*)

SNC : Système Nerveux Central (ou **CNS** pour *Central Nervous System*)

SRY : région du chromosome Y déterminant le sexe (pour *Sex-determining Region of the Y chromosome*)

STAT : transducteurs de signal et activateurs de transcription (pour *Signal Transducers and Activators of Transcription*)

Su(fu) : répresseur de la kinase sérine-thréonine fused (fu)

(pour Suppressor of fused)

- Sxl : protéine Sex-lethal
- T3 : triiodothyronine
- T4 : tétraiodothyronine (thyroxine)

TALENS : nucléases effectrices de type activateur de transcrip-

tion (pour *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) **TCF** : facteur de transcription spécifique aux lymphocytes T (pour *T-Cell specific Factor*)

TEM : Transition Épithélio-Mésenchymateuse

TGF- β **et** α : facteur de croissance transformant α et β (pour *Transforming Growth Factor*- β et α)

TGP : période terminale de croissance (pour *Terminal Growth Period*)

TILLING : ciblage des lésions locales induites dans les génomes (pour *Targeting-Induced Local Lesions in Genomes*)

TME : Transition Mésenchymato-Epithéliale

TNF : facteur de nécrose tumorale (pour Tumor Necrosis Factor)

TOR : cible de la rapamycine (pour *Target Of Rapamycin*)

TSH : thyréostimuline (pour *Thyroid-Stimulating Hormone* ou *thyrotropin*)

TSS : site d'initiation de la transcription (pour *Transcription Start Site*)

Vang : protéine Van Gogh

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (pour *Vascular Endothelial Growth Factor*)

Yap : protéine Yap (pour Yes-associated protein)

Yki : protéine Yorkie

ZLI : Zona Limitans Intrathalamica

ZFN : nucléase à doigt de zinc (pour *Zinc-finger nuclease*)

ZPA : zone d'activité polarisante ou région de polarisation (pour *Zone of Polarizing Activity*)

ZRS : séquence régulatrice de la zone d'activité polarisante

(pour Zone of polarizing activity Regulatory Sequence)

ZSV : Zone Sous-Ventriculaire

1

Histoire et concepts de base

 Les origines de la biologie du développement Un outil conceptuel

Le but de ce chapitre est d'offrir un cadre conceptuel à l'étude du développement. Un aperçu historique de l'étude du développement embryonnaire illustrant comment les questions clés du développement ont été formulées à l'origine, sera suivi de l'exposé des principes essentiels du développement. Comment une cellule unique, le zygote, donne-t-elle naissance à un organisme pluricellulaire dans lequel un grand nombre de types cellulaires s'organisent en tissus et organes pour former un corps tridimensionnel ? Cette question essentielle peut être abordée selon différents angles, tous devant se combiner pour fournir une vision complète du développement : quels sont les aènes exprimés, quand et où le sont-ils ; comment les cellules communiquent entre elles ; comment leur destinée est déterminée ; comment elles prolifèrent et se différencient en types cellulaires spécialisés et comment apparaissent les changements morphologiques majeurs du corps. Le zygote contient toute l'information nécessaire au développement de l'embryon. Le développement d'un organisme est finalement conduit par l'expression régulée de ses gènes, déterminant guand et dans guelles cellules certaines protéines apparaissent. Ces dernières déterminent à leur tour le comportement des cellules. Plus qu'un plan, les gènes fournissent un programme générant le développement puisque leurs actions sont traduites en séquences impliquant la signalisation intercellulaire, la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaire.

Le développement d'un organisme multicellulaire à partir d'une cellule unique, le zygote, est un triomphe de l'évolution. Celui-ci se divise pour donner des millions de cellules qui forment des structures aussi complexes et variées que les yeux, les bras, le cœur ou le cerveau. Cet exploit extraordinaire soulève une multitude de questions. Comment les cellules issues des divisions du zygote diffèrent-elles les unes des autres ? Comment s'organisent-elles selon des structures telles que des membres ou des cerveaux ? Qu'est-ce qui contrôle le comportement des cellules individuelles pour qu'émergent des niveaux d'organisation aussi complexes ? Comment les principes d'organisation du développement sont-ils contenus dans le zygote, et en particulier dans le matériel génétique, l'ADN ? Le plus passionnant de la biologie du développement actuelle réside dans la compréhension croissante de la manière dont les gènes dirigent ces étapes du développement, et le contrôle génétique est l'un des thèmes principaux de cet ouvrage. Le contrôle du développement implique des milliers de gènes, mais seuls ceux qui jouent des rôles clés et illustrent les principes généraux seront considérés.



Fig. 1.1 Œuf fécondé et embryon humains (a) Zygote humain. Les noyaux (pronuclei) du spermatozoïde et de l'ovule n'ont pas fusionné. (b) Embryon humain à environ 51 jours de gestation (stade 20 de Carnegie), qui est équivalent à un embryon de souris à 13,5 jours après la fécondation. Un embryon humain à ce stade fait environ 21-23 mm de longueur.

(a) Aimablement fourni par A. Doshi, CRGH, London. (b) Reproduit avec l'aimable autorisation de MRC/Wellcome-funded Human Developmental Biology Resource.



Fig. 1.2 Crapaud sud-africain, *Xenopus laevis.* Barre d'échelle = 1 cm. *Photographie aimablement communiquée par J. Smith.*

Comprendre comment des embryons se développent est un défi intellectuel, et l'un des objectifs de la biologie du développement est de comprendre, pour plusieurs raisons, comment les humains se développent (Fig. 1.1). Il est nécessaire de comprendre pourquoi parfois cela se passe mal, pourquoi un fœtus n'arrive pas jusqu'à la naissance, ou pourquoi un nouveau-né présente des anomalies congénitales. Le lien avec le contrôle génétique du développement est ici très étroit puisque des mutations sur des gènes peuvent conduire à un développement anormal ; mais des facteurs de l'environnement, tels des médicaments ou infections, peuvent aussi intervenir. Un autre domaine de la recherche médicale en rapport avec la biologie du développement concerne la médecine régénérative, qui établit comment utiliser des cellules pour réparer des tissus ou des organes endommagés, en se focalisant actuellement sur les cellules souches. Celles-ci, pouvant proliférer et donner tous les tissus d'un organisme, sont présentes dans l'embryon. Ces cellules souches, et celles des tissus adultes au potentiel pour se développer plus limité, sont étudiées dans le Chapitre 8. Avec leur faculté de se diviser indéfiniment, les cellules cancéreuses présentent certaines des propriétés des cellules embryonnaires. L'étude de ces cellules et de leur comportement pourrait ainsi conduire vers de nouveaux traitements contre le cancer puisque nombre de gènes impliqués sont communs.

Le développement de l'embryon à partir du zygote constitue l'**embryogenèse**. L'une des premières tâches est d'établir le plan général d'organisation de l'organisme, et cette question fondamentale, résolue différemment selon les organismes, sera abordée dans cet ouvrage. L'accent sera mis sur le développement animal, en particulier celui des vertébrés, grenouilles, oiseaux, poissons et mammifères, dont le développement précoce est abordé dans les Chapitres 3 à 5. Sera également vue une sélection d'invertébrés tels que la drosophile et le nématode, ainsi que l'oursin. Le contrôle génétique du développement est mieux connu chez la drosophile et les nématodes et les traits essentiels de leur développement précoce seront considérés respectivement dans les Chapitres 2 et 6, la drosophile permettant tout au long de cet ouvrage d'illustrer des aspects particuliers du développement. Dans le Chapitre 7 seront brièvement abordés certains aspects du développement des plantes qui diffère, à de nombreux égards, de celui des animaux, mais partage cependant de grands principes de base.

La morphogenèse, ou l'apparition d'une forme et d'une structure, sera examinée Chapitre 9. Dans le Chapitre 10 seront abordés la détermination du sexe et le développement des cellules germinales. La différenciation de cellules non spécialisées en cellules responsables de fonctions précises telles les cellules musculaires et sanguines sera traitée au Chapitre 8. Des structures comme le membre des vertébrés et des organes tels que les yeux de l'insecte ou des vertébrés, le cœur et le système nerveux qui illustrent les questions de l'organisation multicellulaire et de la différenciation des tissus lors de l'embryogenèse, seront détaillés Chapitres 11 et 12. L'étude de la biologie du développement ne se limitant pas au développement de l'embryon, le Chapitre 13 abordera la croissance post-embryonnaire, le vieillissement, la métamorphose et comment certains animaux peuvent régénérer un organe perdu. Chapitre 14, l'examen de l'évolution des mécanismes du développement et des limites que ceux-ci imposent à l'évolution même, permettra d'élargir le débat.

Il paraît nécessaire de traiter le développement d'autant d'organismes différents pour comprendre les traits de base du développement. Les biologistes du développement pensent en fait qu'il existe des principes généraux de développement qui s'appliquent à tous les animaux, mais le vivant est trop diversifié pour trouver toutes les réponses dans un organisme unique. Les biologistes du développement ont ainsi concentré leurs efforts sur un nombre relativement restreint d'animaux, choisis pour la facilité de leur étude, la souplesse des manipulations expérimentales ou de l'analyse génétique. C'est ce qui fait que le crapaud *Xenopus laevis* (Fig. 1.2) et la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, ont une place primordiale dans la biologie du développement. Il en est de même avec l'arabette des dames, *Arabidopsis thaliana*, dont l'étude a permis de découvrir de nombreux aspects du développement végétal.

L'un des aspects les plus fascinants et gratifiants de la biologie du développement est que la compréhension d'un processus de développement chez un organisme peut faciliter la compréhension de processus similaires pour d'autres, et notamment éclairer le développement humain. Ceci est particulièrement bien illustré par l'influence qu'a eue, dans toute la biologie du développement, la connaissance du développement de la drosophile, en particulier ses bases génétiques. L'identification des gènes contrôlant l'embryogenèse précoce chez la drosophile a conduit à la découverte de gènes de la même famille, utilisés dans des voies semblables chez les mammifères et d'autres vertébrés. De telles découvertes portent à croire en l'existence de principes généraux de développement.

Les amphibiens ont longtemps été les organismes préférés pour l'étude du développement précoce en raison de la grande taille de leurs œufs, de la facilité de l'élevage des embryons dans un simple milieu de culture et de leur manipulation. L'embryogenèse chez le crapaud sud-africain *Xenopus laevis* (Encart 1A) illustre certains des stades de base du développement de tous les animaux.

Dans la suite de ce chapitre, sera brièvement abordée l'histoire de l'**embryologie**, habituellement appelée biologie du développement. Le terme de biologie du développement lui-même a une origine beaucoup plus récente et considère que le développement n'est pas seulement limité à l'embryon. Par tradition, l'embryologie décrit les résultats expérimentaux en termes de morphologie et destinée cellulaire, mais maintenant le développement est également compris en termes de génétique moléculaire et de biologie cellulaire. Dans la deuxième partie de ce chapitre seront introduits certains concepts clés maintes fois utilisés dans l'étude et la compréhension du développement.

Les origines de la biologie du développement

De nombreuses questions concernant l'embryologie ont été posées il y a des centaines voire des milliers d'années. Considérer l'histoire de ces idées facilite la compréhension de la manière actuelle d'aborder les questions du développement.

1.1 Aristote définit pour la première fois la question de l'épigenèse *versus* la préformation

L'approche scientifique de l'explication du développement émergea en Grèce avec Hippocrate au V^e siècle avant J.-C. S'appuyant sur des idées de l'époque, il tenta d'expliquer le développement en termes de principes de chaleur, humidité et solidification. Aristote fit progresser l'embryologie en posant un siècle plus tard une question qui a dominé jusqu'au XIX^e siècle, toutes les conceptions sur le développement : comment sont formées les différentes parties de l'embryon ? Deux possibilités furent envisagées : l'une considérant que dans l'embryon tout est préformé dès le début et ne fait que grandir au cours du développement, l'autre que de nouvelles structures apparaissent progressivement, processus qu'il nomma épigenèse (signifiant « au-dessus de la création ») et compara dans une métaphore au « tissage d'un filet ». Aristote penchait pour l'épigenèse et sa conjecture se révéla correcte.

L'influence d'Aristote sur la pensée européenne a été majeure et ses idées sur l'épigenèse sont restées dominantes jusqu'au milieu du XVII^e siècle. La conception opposée, le fait que l'embryon soit préformé dès le départ a, à nouveau été défendue à la fin du XVII^e siècle. Nombreux ont été ceux qui ne pouvaient croire que des forces physiques ou chimiques pouvaient façonner un être vivant tel qu'un embryon. Les croyances de l'époque sur la création divine du monde et de tous les êtres vivants étaient associées à celle selon laquelle tous les embryons existaient depuis le début du monde et que le premier d'une espèce avait dû contenir tous les embryons à venir.

Même le brillant embryologiste du XVII^e siècle Marcello Malpighi, n'a pu se libérer des idées préformistes. Bien que donnant une description remarquablement détaillée du développement de l'embryon de poulet, il resta convaincu, malgré les preuves apportées par ses propres observations, que dès le début l'embryon était complètement formé (Fig. 1.3). Selon lui, aux tout premiers stades, les éléments étaient si petits qu'on ne pouvait les voir, même avec le meilleur des microscopes. D'autres préformistes ont pensé que l'embryon était contenu dans le spermatozoïde et certains soutenaient même voir un humain miniature, un homoncule, dans la tête de chaque spermatozoïde humain (Fig. 1.4).

Le débat acharné sur la préformation/épigenèse perdura tout au long du XVIII^e siècle, mais la question ne put être résolue qu'avec l'une des grandes avancées de la biologie, à savoir la reconnaissance du fait que les êtres vivants, dont l'embryon, sont constitués de cellules.



Fig. 1.3 Description de l'embryon de poulet par Malpighi. La figure montre les dessins de Malpighi réalisés en 1673, représentant l'embryon précoce (haut), et à 12 jours d'incubation (bas). Ces dessins illustrent de façon très exacte la forme de l'embryon et la circulation sanguine. *Copyright The Royal Society*



Fig. 1.4 Certains préformistes croyaient qu'un homoncule était recroquevillé dans la tête de chaque spermatozoïde.

Dessin d'imagination, d'après N. Harspeler (1694).



masse vitelline

Région postérieure Embryon au stade

bourgeon caudal

(vue dorsale après élimination des tissus superficiels)

1.2 La théorie cellulaire a changé les conceptions sur le développement embryonnaire et l'hérédité

Embryon au stade

bourgeon caudal (vue latérale)

Les cellules furent découvertes grâce à l'invention du microscope autour des années 1600, mais la théorie cellulaire de la vie ne se développa qu'entre 1820 et 1880 avec, entre autres, le botaniste allemand Matthias Schleiden et le physiologiste Theodor Schwann. On reconnut alors que tous les organismes vivants étaient constitués de cellules, unités fondamentales de la vie qui ne pouvaient apparaître qu'à partir de la division de cellules pré-existantes. La théorie cellulaire a été une avancée des plus éclairantes en biologie, et a eu un impact immense. Les organismes pluricellulaires, tels que les animaux et les plantes, pouvaient dès lors être considérés comme des communautés de cellules. Ne pouvant plus être basé sur la préformation, le développement devait être épigénétique puisque de nombreuses cellules étaient générées à partir de la division du zygote et que des types cellulaires nouveaux étaient formés. Un pas essentiel dans la compréhension du développement a été fait avec la

Région postérieure (vue dorsale)

Malgré la variété du développement des vertébrés, de nombreuses étapes de base peuvent être illustrées en suivant le développement du crapaud *Xenopus laevis* (Fig. 1). L'ovule est une grande cellule dont la surface de sa partie supérieure (le **pôle animal**) est pigmentée et la partie inférieure (le **pôle végétatif**) se caractérise par l'accumulation de plaquettes vitellines.

La segmentation ou clivage commence après la fécondation de l'ovule par le spermatozoïde et la fusion des deux pronuclei. Entre chaque division mitotique, les cellules ne croissant pas, celles-ci deviennent plus petites au fur et à mesure des divisions. Après environ 12 divisions, l'embryon, nommé alors blastula, comprend de nombreuses cellules entourant une cavité liquidienne, le blastocœle, situé au-dessus de grandes cellules riches en vitellus. Les cellules ont déjà subi des changements et leurs interactions conduisent à la spécification des trois feuillets embryonnaires : mésoderme, endoderme et ectoderme (Encart 1C). La région animale donne naissance à l'ectoderme formant l'épiderme et le système nerveux. La région végétative est à l'origine des futurs endoderme et mésoderme qui formeront les organes internes. À ce stade les cellules demeurent à la surface de l'embryon. Au stade suivant, la gastrulation, un réarrangement cellulaire spectaculaire conduit l'endoderme et le mésoderme en position interne et établit le plan d'organisation de base du têtard. À l'intérieur, le mésoderme donne naissance à une structure en forme de baguette, la chorde, qui s'étend de la tête à la queue en position médiane sous le système nerveux. De chaque côté de la chorde le mésoderme est segmenté en blocs nommés somites qui donneront les muscles, la colonne vertébrale, ainsi que le derme (on peut voir les somites sur la vue en coupe de l'embryon au stade tardif du bourgeon caudal).

Peu après la gastrulation, au-dessus de la chorde, l'ectoderme se creuse pour former le **tube neural** à l'origine de l'encéphale et de la moelle épinière. Pendant ce processus nommé la **neurulation**, la position future d'autres organes tels que les membres, les yeux et les branchies est déterminée, mais leur développement ne se fera que plus tard lors de l'**organogenèse**, avec la différenciation de cellules spécialisées telles que les cellules du muscle et du cartilage ainsi que les neurones. Quatre jours après la fécondation, l'embryon est devenu un têtard pouvant nager, et ayant les traits typiques des vertébrés.

reconnaissance dans les années 1840 du zygote comme une cellule unique bien que spécialisée.

En proposant au XIX^e siècle qu'un descendant n'hérite pas du parent ses caractéristiques corporelles (le soma) mais seulement de ses **gamètes** (ovule et spermatozoïde), le biologiste allemand August Weismann fit faire un progrès important à la biologie. En énonçant que les caractéristiques acquises au cours de la vie d'un individu ne pouvaient pas être transmises à la lignée germinale, il établit une distinction fondamentale entre les gamètes et les autres cellules du corps ou **cellules somatiques**. (Fig. 1.5). En ce qui concerne l'hérédité, le corps est seulement un transporteur de gènes. Comme ce fut énoncé par le nouvelliste et essayiste anglais Samuel Butler, « une poule n'est que le moyen de faire un autre œuf à partir d'un œuf ».

Chez l'oursin il fut montré qu'après la fécondation l'œuf contient deux noyaux qui fusionneront, l'un issu de l'ovotide constituant l'ovule, l'autre du spermatozoïde. La fécondation conduit donc à une cellule unique, le **zygote**, avec un noyau contenant du matériel des deux parents, amenant à la conclusion que le noyau de la cellule contient le support physique de l'hérédité. Cette ligne de recherche connut son apogée vers la fin du XIX^e siècle avec la démonstration qu'à l'intérieur du noyau de l'œuf, les chromosomes proviennent en nombre égal des noyaux des deux parents, et l'acceptation que cela constituait le fondement physique de la transmission des caractères génétiques



Fig. 1.5 Distinction entre cellule germinale et cellule somatique. À chaque génération une cellule germinale participe à la formation du zygote, qui donne naissance à la fois aux cellules somatiques et cellules germinales, mais l'héritage se fait uniquement par les cellules germinales (à gauche). Des changements se produisant à la suite d'une mutation (en rouge) dans une cellule somatique peuvent être transmis aux cellules filles mais ne pas affecter les cellules germinales, ce qui est montré au centre). Par contre, une mutation dans une cellule germinale (en vert) à la seconde génération sera présente dans chaque cellule du corps du nouvel organisme auquel cette cellule participe, et sera également transmise à la troisième génération et aux suivantes à travers les cellules de la lignée germinale, ce qui est représenté à droite.



supposait que des facteurs nucléaires se répartissaient de façon asymétrique entre les cellules filles lors du clivage, et déterminaient leur futur développement.

Fig. 1.7 Expérience de Roux évaluant la théorie du développement mosaïque de Weismann. Après la première division de l'embryon de grenouille, l'une des deux cellules est détruite en la piquant avec une aiguille chauffée, l'autre restant intacte. Au stade blastula, la cellule intacte s'est divisée en de nombreuses cellules constituant un demi-embryon. Le développement du blastocœle, une petite cavité remplie de liquide au centre de la blastula, se limite également à la moitié intacte. Aucune cellule ne s'est formée à partir de la moitié détruite de l'embryon. Au stade neurula, la cellule intacte génère une forme ressemblant à un demi-embryon normal.



selon les lois développées par le moine et botaniste autrichien Gregor Mendel. C'est un type de division particulier des cellules germinales, nommé **méiose**, qui permet en divisant le nombre de chromosomes par deux, de conserver leur nombre constant de génération en génération, le nombre complet de chromosomes étant retrouvé ensuite lors de la fécondation. Le zygote et les cellules somatiques qui en sont issues se divisent par **mitoses**, qui maintiennent le nombre de chromosomes (Encart 1B). Les cellules germinales contiennent une copie unique de chaque chromosome et sont dites **haploïdes** alors que les précurseurs des cellules germinales et les cellules somatiques du corps en contiennent deux et sont appelées **diploïdes**.

1.3 Deux types principaux de développement furent initialement proposés

Comment les cellules se différencient les unes des autres au cours du développement a été la grande question qui s'est posée ensuite. Le rôle du noyau prenant de plus en plus d'importance, Weismann proposa un modèle de développement où le noyau du zygote contenait des facteurs particuliers ou **déterminants** (Fig. 1.6). Il suggéra que lors des cycles cellulaires rapides de la **segmentation** ou **clivage** (Encart 1A), ces déterminants nucléaires se distribuaient de façon inégale entre les cellules filles issues du zygote et contrôlaient ainsi le développement futur de ces cellules. Le destin de chaque cellule était ainsi prédéterminé dans le zygote par les facteurs qu'elle recevait au moment de la segmentation. Le zygote pouvant être considéré comme une mosaïque de déterminants distincts et localisés, ce type de modèle a été nommé « mosaïque ». L'hypothèse au cœur de la théorie de Weismann était, qu'en raison d'une distribution inégale de composants nucléaires, les divisions cellulaires précoces conduisaient à des cellules tout à fait distinctes les unes des autres.

À la fin des années 1880, les idées de Weismann furent d'abord étayées par les expériences sur l'embryon de grenouille menées de façon indépendante par l'embryologiste allemand Wilhelm Roux. Après la première division du zygote de grenouille, Roux détruisit une des deux cellules au moyen d'une aiguille chauffée et observa que la cellule restante donnait une demi-larve bien développée (Fig. 1.7). Sa conclusion fut que « le développement de la grenouille est basé sur un mécanisme mosaïque, les caractéristiques et le destin des cellules étant déterminés à chaque division ».

Mais quand le compatriote de Roux, Hans Driesch, répéta l'expérience sur l'œuf d'oursin, le résultat fut tout à fait différent (Fig. 1.8). Plus tard, il écrivit : « mais les choses ont produit ce qu'elles devaient donner et pas ce que j'attendais ; le matin suivant il y avait vraiment une gastrula complète dans la boîte, distincte seulement par sa



ENCART 1B Le cycle cellulaire de la mitose

La duplication de la cellule eucaryote résulte d'une séquence d'étapes nommée le **cycle cellulaire**. La taille de la cellule augmente, l'ADN est répliqué, puis les chromosomes répliqués lors de la mitose se répartissent dans les deux noyaux fils. Ce n'est qu'ensuite que la cellule se divise pour donner deux cellules filles, qui peuvent reproduire la même séquence.

Le cycle classique mitotique d'une cellule eucaryote est scindé en deux phases bien marquées (Figure 1). Lors de la mitose ou phase M, la division cellulaire donne deux nouvelles cellules. La suite du cycle cellulaire, entre une phase M et la suivante, est nommée interphase. La réplication de l'ADN survient lors d'une période définie de l'interphase, la phase S (S pour synthèse de l'ADN). La phase S est précédée d'une période nommée G, (G pour gap ou intervalle) et suivie d'un second intervalle nommé G, à l'issue duquel la cellule entre en mitose (voir figure). G₁, la phase S et G₂ forment ensemble l'interphase, partie du cycle cellulaire au cours de laquelle la cellule synthétise des protéines, croît et réplique son ADN. Quand les cellules somatiques ne prolifèrent pas, elles sont en général dans un stade nommé G_n, dans lequel elles entrent après une mitose. La décision d'entrer en G₀ ou de continuer en G₁ pourrait être contrôlée à la fois par un état intracellulaire ou par des signaux extracellulaires comme des facteurs de croissance. Ceux-ci permettent à la cellule de sortir de G_o et d'entrer dans le cycle cellulaire. Des cellules comme les neurones ou les cellules des muscles squelettiques ne se divisent pas après la différenciation et restent en permanence en G_o.



Des phases précises du cycle cellulaire sont absentes dans certaines cellules : lors de la segmentation du zygote de xénope, G_1 et G_2 sont virtuellement absentes, les cellules devenant plus petites à chaque division. Dans les glandes salivaires de la drosophile il n'y a pas de phase M, l'ADN se répliquant continuellement sans division cellulaire, ce qui conduit à la formation de chromosomes polytènes géants.

plus petite taille, et cette gastrula, petite mais complète, donna une larve complète et caractéristique ».

Driesch en séparant complètement les cellules au stade deux cellules avait obtenu une larve normale mais petite. Ce résultat, exactement opposé à celui de Roux, fut la première démonstration du processus de développement connu sous le nom de régulation. L'expérience de Roux sur la grenouille fut répétée plus tard par l'américain T.H. Morgan, qui obtint le même résultat que Roux sur l'oursin, en séparant



Fig. 1.8 Résultat de l'expérience de Driesch sur l'embryon d'oursin, première démonstration du phénomène de régulation. Après la séparation des cellules au stade 2 cellules, la cellule survivante génère une larve normale, petite mais complète. Ce résultat est contraire à ceux, antérieurs, de Roux montrant qu'après destruction de l'une des deux cellules d'un embryon de grenouille au stade 2, la cellule restante génère un demi-embryon seulement (voir Fig. 1.7).



Fig. 1.9 Démonstration spectaculaire de Spemann et Mangold de l'induction d'un nouvel axe corporel par la région organisatrice chez la gastrula d'amphibien. Un fragment de tissu (en jaune) prélevé à la lèvre dorsale du blastopore d'un triton (Triton cristatus) au stade gastrula est greffé sur la face opposée de la gastrula d'une autre espèce, pigmentée, (Triton taeniatus, en rose). Le tissu greffé induit un nouvel axe corporel avec un tube neural et des somites. Le greffon de tissu non pigmenté forme, au nouveau site, une chorde (voir partie inférieure de la figure) mais la majeure partie du tube neural et les autres structures du nouvel axe ont été induites à partir du tissu pigmenté de l'hôte. La région organisatrice découverte par Spemann et Mangold est nommée l'organisateur de Spemann.

les deux blastomères plutôt qu'en en détruisant un, tout en le laissant attaché. Ceci montra la capacité générale des embryons de vertébrés à la régulation, c'est-à-dire rétablir un développement normal, même après ablation ou réarrangement de parties lors du développement précoce. Le fondement de ce phénomène est expliqué plus loin dans ce chapitre. L'ampleur des capacités de régulation des embryons diffère selon les espèces et de nombreux exemples de régulation seront présentés tout au long de cet ouvrage. L'existence de la régulation ne signifie cependant pas que la distribution inégale de déterminants conduisant à deux cellules filles différentes est négligeable lors du développement. Mais Weismann avait tort sur un point capital : ces déterminants sont cytoplasmiques et non nucléaires. De nombreux exemples de protéines et ARN dont l'importance est cruciale au cours du développement en tant que **déterminants cytoplasmiques** seront décrits.

1.4 La découverte de l'induction montra qu'un groupe de cellules pouvait déterminer le développement des cellules voisines

La régulation possible au sein de l'embryon implique une communication et interaction entre les cellules, mais l'importance centrale des **interactions cellule-cellule** dans le développement embryonnaire ne fut réellement établie qu'avec la découverte du phénomène d'**induction**. Celle-ci survient quand une cellule ou un tissu dirige le développement d'une cellule ou d'un autre tissu voisin.

La preuve spectaculaire de l'importance de l'induction et des autres interactions cellule-cellule dans le développement fut fournie en 1924 quand Hans Spemann et son assistante Hilde Mangold menèrent l'expérience désormais célèbre de greffe sur des embryons d'amphibien. Ils montrèrent qu'un second embryon complet pouvait être induit en greffant une petite région d'un jeune embryon de triton chez un autre embryon de même âge (Fig. 1.9). Le tissu greffé fut prélevé sur la lèvre dorsale du **blastopore**, invagination en forme de fente apparaissant sur la face dorsale de l'embryon d'amphibien, là où commence la gastrulation (Encart 1A). Puisque cette petite région semblait finalement responsable du contrôle de l'organisation d'un embryon complet, ils l'appelèrent organisateur ; elle est maintenant connue sous le nom d'**organisateur de Spemann-Mangold** ou simplement **organisateur de Spemann**. Spemann reçut en 1935, pour cette découverte, le Prix Nobel de Médecine ou Physiologie, le premier attribué à des recherches en embryologie. Malheureusement Hilde Mangold, décédée dans un accident, ne put être associée à ces honneurs.

1.5 La biologie du développement émergea de l'union de la génétique et de l'embryologie

La redécouverte des lois de Mendel en 1900, coïncida avec un engouement pour les mécanismes de l'hérédité davantage en lien avec les questions d'évolution que celles concernant l'embryologie. La génétique était considérée comme l'étude de la transmission des caractères héréditaires d'une génération à l'autre, alors que l'embryologie étudiait comment un organisme donné se développait et en particulier comment les cellules d'un jeune embryon devenaient différentes les unes des autres. À cet égard, la génétique semblait sans rapport avec le développement.

En ce premier quart du XX^e siècle, T.H. Morgan apportait de solides bases conceptuelles et expérimentales à la génétique naissante. Morgan choisit la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* comme modèle expérimental. Remarquant une drosophile aux yeux blancs au lieu des yeux rouges habituels, il montra grâce à des croisements méticuleux, que l'héritage de ce caractère mutant était lié au sexe de la drosophile. Il trouva trois autres caractères liés au sexe et établit qu'ils étaient déterminés par trois *loci* distincts occupant des positions différentes sur le même chromosome, le chromosome X de la drosophile. Les « facteurs » héréditaires plutôt abstraits de Mendel devenaient réels. Bien qu'embryologiste à l'origine, Morgan influença peu la compréhension du développement en termes de génétique et il fallut attendre que la nature des gènes fût mieux comprise.

Un concept important dans la compréhension de la manière dont les gènes influencent les traits physiques et physiologiques repose sur la distinction entre **génotype** et **phénotype**. Le botaniste danois Wilhelm Johannsen a été le premier à le proposer en 1909. Le bagage génétique d'un organisme, l'information génétique qu'il hérite de ses parents, est le génotype. L'apparence visible d'un organisme, sa structure interne et sa biochimie forment le phénotype. Le génotype contrôle bien sûr le développement, mais les facteurs environnementaux influencent le phénotype en interagissant avec le génotype. Malgré un génotype identique, de vrais jumeaux peuvent au cours de la croissance développer des différences importantes dans leur phénotype (Fig. 1.10), et celles-ci tendent à devenir plus évidentes avec l'âge.

Après les découvertes de Morgan en génétique, le problème du développement put alors être posé en termes de relations entre le génotype et le phénotype : comment le bagage génétique se traduit ou est exprimé au cours du développement pour donner naissance à un organisme fonctionnel. Mais l'union de la génétique et de l'embryologie a été lente et complexe. Le tournant décisif est apparu dans les années 1940 avec la découverte de l'ADN constituant les gènes et codant les protéines. Comme il était déjà évident que les propriétés d'une cellule sont déterminées par les protéines qu'elle contient, on put enfin évaluer le rôle fondamental des gènes dans le développement. En contrôlant quelles étaient les protéines synthétisées dans une cellule, les gènes pouvaient contrôler les changements apparaissant au cours du développement, dans leurs propriétés et leur comportement. La découverte de certains gènes codant des protéines qui contrôlent l'activité d'autres gènes fut une autre avancée fondamentale dans les années 1960.

1.6 Le développement est étudié avant tout au travers d'organismes modèles

Bien que l'embryologie de nombreuses espèces ait été étudiée à un moment ou un autre, la connaissance des mécanismes du développement est fondée sur un nombre relativement limité d'organismes. Considérés comme des « modèles » pour la compréhension des processus impliqués, ils sont souvent appelés organismes modèles. Les oursins et les amphibiens ont été les principaux animaux utilisés pour les investigations expérimentales en raison de la facilité d'obtention de leurs embryons et, pour les amphibiens, de la facilité des manipulations, même à des stades plutôt tardifs. Les principaux modèles vertébrés actuellement étudiés sont le crapaud Xenopus laevis, la souris Mus musculus, le poulet Gallus gallus et le poisson-zèbre Dario rerio. Parmi les invertébrés, l'attention s'est concentrée sur la mouche du vinaigre Drosophila melanogaster et le nématode Caenorabditis elegans, en raison de la quantité de connaissances sur leur génétique de développement et de la facilité de leur transformation génétique. Deux prix Nobel ont été attribués pour récompenser les découvertes faites, respectivement, sur le développement de la drosophile et du nématode. Les méthodes modernes d'analyse génétique ont aussi permis un regain d'intérêt pour l'oursin Strongylocentrotus purpuratus. En biologie du développement végétal, Arabidopsis thaliana est le principal organisme modèle. Les cycles de vie et les détails généraux sur ces organismes sont fournis plus loin dans les chapitres correspondants. La figure 1.11 présente les relations de ces organismes en termes d'évolution.

Les raisons de ces choix sont en partie liées à la facilité de l'étude et de l'intérêt biologique, et en partie historiques : quand un certain nombre de recherches a été réalisé sur une espèce, il est plus rentable de continuer son étude plutôt que de recommencer depuis le début avec une autre espèce. En tant que modèle de développement chaque espèce a ses avantages et inconvénients. L'embryon de poulet, par exemple, a longtemps été étudié comme modèle de développement de vertébré car les zygotes sont faciles à obtenir et les embryons résistent très bien aux manipulations de microchirurgie expérimentale. Un inconvénient a été que jusqu'à récemment on connaissait peu de chose sur la génétique du développement du poulet. Par contre les connaissances sont nombreuses sur la génétique de la souris, bien que celle-ci soit à certains égards plus difficile à étudier, le développement se déroulant normalement entièrement au sein de la mère. Il est toutefois possible de féconder les ovules de la souris in vitro, de les laisser se développer un court temps en dehors de l'utérus tout en les observant, avant de réimplanter les jeunes embryons pour qu'ils achèvent leur développement. De nombreuses mutations liées au développement ont été identifiées chez la souris qui peut aussi être transformée génétiquement par les techniques de transgenèse permettant d'introduire, d'inactiver ou de modifier des gènes. C'est également le meilleur modèle expérimental disponible pour l'étude du développement des mammifères. Le



Fig. 1.10 Différence entre génotype et phénotype. Ces vrais jumeaux, issus de la scission du zygote au moment du développement, ont le même génotype. Leur apparence légèrement différente résulte de facteurs non génétiques, telles que des influences environnementales.

Photographie aimablement communiquée par Josè et Jaime Pascual.



Informations supplémentaires concernant les Ascidies



Fig. 1.11 Arbre phylogénétique situant l'emplacement des principaux organismes modèles de développement. Les organismes présentés dans cet ouvrage sont surlignés en bleu. *Le développement des ascidies est décrit en ligne.

poisson-zèbre a été rajouté plus récemment à la liste des organismes modèles pour les vertébrés ; sa reproduction à grande échelle est facile, ses embryons sont transparents si bien que les divisions cellulaires et les mouvements tissulaires peuvent être suivis *de visu*, et son potentiel d'investigations génétiques est immense.

Comprendre comment les gènes contrôlent le développement embryonnaire est un des buts essentiels de la biologie du développement, et pour ce faire il est nécessaire d'identifier tout d'abord, parmi plusieurs milliers de gènes contenus dans l'organisme, ceux qui sont impliqués de façon cruciale et spécifique dans le contrôle du développement. Cette tâche peut être abordée de multiples façons en fonction de l'organisme étudié, mais le point de départ commun est d'identifier les mutations génétiques altérant le développement de façon spécifique et informative, comme décrit dans la section suivante. Les techniques d'identification de ces gènes de développement, de détection et de manipulation de leur expression dans l'organisme sont décrites tout au long de cet ouvrage, avec les techniques de manipulation des gènes eux-mêmes.

Comme cela vient d'être dit, certains des organismes modèles sont plus aptes à l'analyse génétique conventionnelle que d'autres. Malgré son importance en biologie du développement, la génétique conventionnelle a été peu étudiée chez *X. laevis*, qui a l'inconvénient d'être **tétraploïde** (ses cellules somatiques ont quatre exemplaires de chaque chromosome, alors que les cellules des organismes diploïdes comme l'homme et la souris n'en ont que deux) et une longue période d'élevage avec un à deux ans pour atteindre la maturité sexuelle. Les techniques de la génétique moderne et de la bioinformatique ont cependant permis d'identifier de nombreux gènes de développement chez *X. laevis* par la comparaison directe de séquences d'ADN avec des gènes connus chez la drosophile et la souris. Le crapaud *Xenopus tropicalis*, très proche, est une espèce plus intéressante pour l'analyse génétique, étant diploïde et pouvant aussi être manipulé génétiquement pour donner des organismes transgéniques.

L'information héréditaire d'un organisme donné, comprenant l'ensemble de ses gènes, dont les séquences non codantes de l'ADN, est appelée **génome**. Chez les espèces diploïdes à reproduction sexuée, chaque cellule somatique contient dans ses chromosomes deux copies complètes du génome, l'une héritée du père, l'autre de la mère. Les séquences du génome sont disponibles pour chacun des organismes modèles, certaines plus complètes que d'autres. Chez le poisson-zèbre, une duplication du génome s'étant produite lors de son histoire évolutive, fait qu'il y a des duplicatas d'au moins 2 900 gènes sur les 20 000 estimés dans son génome, codant des protéines. Le génome du poisson-zèbre contient ainsi un total de plus de 26 000 gènes codant des protéines, alors que celui de la souris n'en contient que 22 000. La possession des séquences d'ADN complètes du génome des organismes modèles aide considérablement à l'identification des gènes du développement et d'autres séquences d'ADN importantes pour le développement.

En général, quand un gène du développement important a été identifié chez une espèce, il s'avère très instructif de regarder si un gène correspondant est présent et intervient dans les capacités de développement chez une autre espèce. De tels gènes sont souvent identifiés par un degré de similarité suffisant dans la séquence oligonucléotidique, indiquant qu'ils descendent d'un gène ancestral commun et sont qualifiés de gènes homologues. Comme cela sera abordé Chapitre 5, cette démarche a permis d'identifier une classe de gènes de vertébrés jusque-là insoupçonnée, contrôlant le patron régulier de la segmentation depuis la tête jusqu'à la queue, qui apparaît à des positions différentes chez les différents types de vertébrés. Ces gènes ont été identifiés par leur homologie avec des gènes qui déterminent l'identité des différents segments du corps de la drosophile (décrit Chapitre 2).

1.7 Les premiers gènes du développement ont été identifiés grâce à des mutations spontanées

La plupart des espèces traitées dans cet ouvrage sont des espèces diploïdes à reproduction sexuée : leurs cellules somatiques contiennent deux copies de chacun des gènes, exceptés ceux portés par les chromosomes sexuels. Chez une espèce diploïde, une copie, ou **allèle**, de chaque gène est fournie par le parent mâle, l'autre par le parent femelle. Dans la population, de nombreux gènes présentent plusieurs allèles distincts, ce qui conduit aux phénotypes variés qui apparaissent chez toute espèce à reproduction sexuée. Cependant, une mutation peut parfois apparaître de façon spontanée sur un gène et se traduire par un changement évident, souvent délétère, sur le phénotype de l'organisme.

De nombreux gènes affectant le développement ont été identifiés grâce à des mutations spontanées qui perturbent leur fonction et induisent un phénotype anormal. Les mutations sont généralement classées selon qu'elles sont dominantes ou récessives (Fig. 1.12). Présentes sur un seul allèle d'une paire, les mutations **dominantes** et **semi-dominantes** produisent un phénotype distinct, c'est-à-dire qu'elles ont un effet à l'état **hétérozygote**. Au contraire, les mutations récessives modifient le phénotype uniquement quand les deux allèles sont mutés ; cet état est nommé **homozygote**. Dans le cas de mutations récessives, la fonction du gène



Fig. 1.12 Types de mutations. À gauche : une mutation est récessive quand elle a un effet uniquement à l'état homozygote, c'est-à-dire quand les deux copies du gène portent la mutation. La mutation vestigial (vg) chez la drosophile conduit à une absence d'ailes à l'état homozygote. Le signe plus (+) indique un allèle « normal » (type sauvage), et le moins (-) indique l'allèle récessif. À droite : au contraire, une mutation dominante ou semi-dominante produit un effet sur le phénotype à l'état hétérozygote, c'est-à-dire quand seulement une copie des deux gènes porte la mutation. La mutation brachvurv chez la souris a un effet évident mais non létal à l'état hétérozygote, mais létal à l'état homozygote. *T* indique l'allèle muté dominant du gène brachyury.

sauvage est suffisante pour produire un phénotype normal chez les hétérozygotes, alors que dans le cas de mutations dominantes ou semi-dominantes l'effet de l'allèle muté empêche complètement ou partiellement celui du gène sauvage chez l'hétérozygote.

En général, les mutations dominantes sont plus évidentes, en particulier si les modifications phénotypiques portent sur la morphologie générale ou la couleur, et à condition qu'elles ne soient pas à l'origine de la mort précoce de l'embryon à l'état hétérozygote. Les vraies mutations dominantes sont rares. Cependant, si un seul allèle fonctionnel n'est pas suffisant pour produire la fonction complète d'un gène, un mutant hétérozygote aura un phénotype anormal. Un exemple est fourni par la souris porteuse d'une copie de l'allèle mutant du gène brachyury désigné par T. Ces souris hétérozygotes (T/+) ont une queue courte. En raison de ce phénotype, le gène affecté chez les mutants a été appelé brachyury (du grec brachy court et oura queue). Quand la mutation est homozygote (T/T), l'effet est plus important et les embryons meurent à un stade précoce, avec des corps très petits, indiquant que le gène brachyury est nécessaire au développement normal de l'embryon (Fig. 1.13). Quand les études d'élevage ont confirmé qu'un seul gène était impliqué, les techniques de cartographie génique ont pu localiser la mutation sur un site d'un chromosome particulier. Il fut alors observé que l'allèle T correspondait à une délétion du gène brachyury.

L'identification de gènes affectés par des mutations récessives est plus laborieuse, puisque l'hétérozygote a un phénotype identique à l'organisme normal sauvage, et qu'un programme d'élevage bien élaboré est nécessaire pour obtenir des homozygotes. Chez les mammifères, l'identification des mutations récessives liées au développement, potentiellement létales, nécessite une observation et une analyse soigneuses, puisque la mort *in utero* des homozygotes peut passer inaperçue.

De nombreuses mutations chez les invertébrés ont été identifiées comme des **mutations conditionnelles**. Les effets de ces mutations ne sont visibles que si l'animal est maintenu dans des conditions particulières, le plus souvent à une température plus élevée, la mutation étant alors nommée **mutation sensible à la température**. À la température ambiante ordinaire les animaux sont normaux. La sensibilité à la température résulte habituellement du codage de protéines mutantes capables de se replier en une structure fonctionnelle à température normale, mais devenant moins stable à température plus élevée.

Des critères très rigoureux doivent être appliqués pour identifier les mutations affectant un processus concernant purement le développement et non des fonctions vitales comme les fonctions de « ménage » sans lesquelles l'organisme ne peut survivre. Un critère simple pour une mutation liée au développement est qu'elle conduit à la mort de l'embryon, mais les mutations sur des gènes impliqués dans ces fonctions



Fig. 1.13 Génétique de la mutation semi-dominante *T*, qui invalide le gène brachyury chez la souris. Un mâle hétérozygote porteur de la mutation *T* a seulement une queue plus courte. Croisé avec une femelle normale homozygote, de type sauvage avec un gène brachyury (+/+), certains des descendants seront aussi hétérozygotes avec une queue courte. Le croisement de deux hétérozygotes donnera certains descendants homozygotes pour la mutation (*T*/*T*), entrainant une anomalie de développement sévère et létale avec une absence de développement du mésoderme postérieur. vitales d'entretien ont le même effet. Les mutations qui produisent un développement anormal visible de l'embryon sont des candidats plus prometteurs pour de vraies mutations de développement. Dans les chapitres suivants sera vu comment le criblage à grande échelle des mutations induites par des agents mutagènes chimiques, ou les rayons X, a permis l'identification de gènes de développement en un nombre bien plus grand que n'a pu le faire la simple observation de rares mutations spontanées.

De nouvelles techniques d'identification de gènes de développement récemment mises au point, nécessitent de connaître l'existence et la séquence d'un gène (par exemple à partir des séquences génomiques) et d'étudier sa fonction dans l'organisme, en général en le supprimant ou en bloquant sa fonction. De telles méthodes font partie de la génétique inverse, opposée aux méthodes traditionnelles de la génétique classique envisagée ci-dessus. Les exemples de génétique inverse incluent l'invalidation de gènes (*knock-out*), pour laquelle le gène est effectivement invalidé au niveau du génome de l'animal par des techniques de transgenèse (discutées section 3.10), et l'extinction de gène (*knock down*) pour laquelle l'expression du gène est entravée par des techniques telles que l'ARN interférence ou les ARN anti-sens (discuté Encart 6B).

RÉSUMÉ

L'étude du développement embryonnaire est apparue il y a plus de 2000 ans en Grèce quand Aristote émit l'idée que les embryons n'étaient pas des êtres miniatures complètement préformés dans l'œuf, mais que la forme et la structure se constituaient progressivement avec le développement de l'embryon. Au cours des XVIIe et XVIII^e siècles, ceux qui croyaient en la préformation remirent en cause cette idée en défendant que tous les embryons passés et à venir existaient depuis l'origine du monde. Au XIX^e siècle, l'émergence de la théorie cellulaire, avec le spermatozoïde et l'ovule comme cellules uniques bien que hautement spécialisées, permit de trancher en faveur de l'épigenèse. Des expériences initiales montrèrent que les embryons précoces d'oursin, qui se développent normalement même si des cellules sont supprimées ou tuées, sont doués de régulation. Le principe de base était alors fixé : le développement doit dépendre, au moins en partie, de communications entre les cellules de l'embryon. La preuve directe de l'importance de ces communications intercellulaires fut apportée en 1924 par l'expérience de greffe de la région de l'organisateur par Spemann et Mangold, montrant que les cellules greffées induisaient un nouvel embryon à partir du tissu de l'hôte. Le rôle des gènes contrôlant le développement, en désignant les protéines à synthétiser, n'a été complètement compris que dans les cinquante dernières années, et plus récemment les techniques de biologie moléculaire et l'accès aux séquences d'ADN du génome entier ont grandement facilité l'étude des bases génétiques du développement.

Un outil conceptuel

La fascination et le défi de la biologie du développement résident dans le destin le plus complexe qu'une cellule vivante isolée puisse subir : se développer en un organisme multicellulaire. Pourtant, seuls quelques principes de base sont nécessaires pour commencer à donner un sens aux processus du développement. La suite de ce chapitre est dédiée à l'introduction des concepts de base. Ces principes seront revus maintes fois au cours de cet ouvrage, avec l'étude des différents organismes et systèmes de développement, et devront être considérés comme des outils conceptuels, essentiels pour s'immerger dans l'étude du développement.

Les gènes contrôlent le développement en déterminant le lieu et le moment de la synthèse de protéines. Leur activité établit des réseaux intracellulaires d'interactions entre les protéines et les gènes, entre les protéines elles-mêmes, ce qui confère leurs propriétés aux cellules. L'une de ces propriétés est l'aptitude des cellules à communiquer entre elles et à se répondre. La manière dont l'embryon se développe repose sur

ces communications cellule-cellule ; aucun processus de développement ne peut ainsi être attribué à la fonction d'un seul gène ou d'une seule protéine. Les données moléculaires et génétiques sur les processus de développement sont maintenant colossales. L'approche de cet ouvrage sera très sélective avec des détails moléculaires donnés seulement s'ils apportent une idée sur les mécanismes de développement et illustrent ces principes de base.

1.8 Le développement inclut l'émergence du patron d'organisation, le changement de forme, la différenciation cellulaire et la croissance

Chez la plupart des embryons, la fécondation est immédiatement suivie de divisions cellulaires. Appelée segmentation ou clivage, cette étape divise le zygote en un certain nombre de cellules plus petites (Fig. 1.14). Contrairement aux divisions cellulaires lors de la croissance d'un tissu, il n'y a pas ici d'augmentation de la taille des cellules entre chaque division ; les cycles cellulaires de segmentation consistent simplement en phases de réplication de l'ADN (phases S), et phases M (Encart 1B). Les embryons jeunes ne sont donc pas plus gros que le zygote, et leur taille croît peu pendant l'embryogenèse, sauf si l'embryon a accès à une source importante qu'il peut utiliser pour se développer, par exemple, une grande quantité de vitellus à la disposition de l'embryon de poulet et les nutriments fournis à l'embryon de mammifère *via* le placenta.

Le développement est en substance l'émergence de structures organisées à partir d'un groupe très simple de cellules. Il est commode de distinguer quatre principaux processus de développement, se produisant selon un ordre à peu près séquentiel, mais en réalité se chevauchant et s'influençant considérablement l'un l'autre. Ils incluent l'élaboration du patron du développement, la morphogenèse, la **différenciation cellulaire** et la croissance. La formation de ce patron est le processus par lequel l'activité cellulaire est organisée dans l'espace et le temps de sorte qu'une structure bien ordonnée se développe au sein de l'embryon. Il est d'une importance capitale chez l'embryon précoce et aussi plus tard pour la formation d'organes. Dans le développement du bras, par exemple, il permet aux cellules de « savoir » si elles doivent faire un bras ou des doigts, et où former les muscles. Il n'y a pas de stratégie universelle pour cette mise en place de l'organisation corporelle. Au contraire, il s'agit du résultat de mécanismes cellulaires et moléculaires variés dans différents organismes et à différents stades de développement.

Le plan corporel d'organisation se met en place, avec la définition des principaux axes de l'embryon qui vont de la tête (antérieur) à la queue (postérieur), et du dos (dorsal) à la face inférieure (ventral). Dans cet ouvrage, la plupart des espèces considérées ont une tête à une extrémité et une queue à l'autre, et les côtés gauche et droit du corps présentant une symétrie bilatérale, c'est-à-dire en miroir l'un par rapport à l'autre. Chez ces espèces, l'axe du corps principal est l'axe antéro-postérieur, qui relie la tête à la queue. Les espèces à symétrie bilatérale ont aussi un axe dorso-ventral, allant du dos vers le ventre. Une caractéristique remarquable de ces axes est qu'ils sont presque toujours orthogonaux et constituent ainsi un système de coordonnées permettant de définir n'importe quel point du corps (Fig. 1.15). En interne, les espèces présentent des différences distinctes entre leurs côtés gauche et droit dans la disposition de leurs organes internes, le cœur humain, étant par exemple, du côté gauche. Chez les plantes, l'axe du corps principal va de la pointe de croissance (l'apex) vers les racines et est nommé l'axe apico-basal. Les plantes ont également une symétrie radiaire, avec un axe radiaire partant du centre de la tige vers l'extérieur.

Avant même que les axes du corps ne soient évidents, les zygotes et les embryons présentent souvent une **polarité** nette, ce qui dans ce contexte signifie qu'ils ont une orientation intrinsèque, avec une extrémité distincte de l'autre. La polarité peut être



Fig. 1.14 Microphotographies de la segmentation d'un œuf de xénope.

Images aimablement communiquées par Dr. H. Williams.


Fig. 1.15 Principaux axes d'un embryon en cours de développement. Les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont orthogonaux, comme dans un système de coordonnées cartésiennes.

déterminée par le gradient d'une protéine ou d'une autre molécule, l'orientation du gradient fournissant la direction. Les cellules individuelles au sein de l'embryon peuvent également avoir leur polarité propre. Un type de polarité est la **polarité apico-basale** observée dans les **épithéliums** simples, feuillets cellulaires monocouches pour lesquels les deux faces du feuillet (faces apicales et basales) sont distinctes (voir Chapitre 9). Un second axe de polarité dans les cellules peut être discerné selon le plan du tissu, ce qui fournit un système de coordonnées à plus grande échelle pour le tissu. Ce type de polarité individuelle de la cellule, la **polarité planaire cellulaire**, est discuté plus loin (Chapitres 2 et 9). La polarité cellulaire planaire est parfois bien visible dans certaines structures, tels les poils produits par les cellules épidermiques en bordure de l'aile de drosophile pointant tous vers la même direction.

Au moment même où les axes de l'embryon se forment les cellules sont affectées aux différents feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme (Encart 1C). Au cours de l'élaboration ultérieure de l'organisation corporelle, les

ENCART 1C Feuillets embryonnaires

Le concept de feuillet embryonnaire est utile pour distinguer les régions de l'embryon précoce qui donnent naissance à des types tout à fait distincts de tissus. Cela s'applique à la fois aux vertébrés et non vertébrés. Toutes les espèces traitées dans cet ouvrage, exceptée l'hydre, sont triploblastiques, avec trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, donnant l'épiderme de la peau et le système nerveux ; le mésoderme, donnant le système squeletto-musculaire, les tissus conjonctifs et des organes internes tels que le rein et le cœur ; et l'endoderme donnant l'épithélium fonctionnel du tube digestif et les dérivés de ce dernier tels que le foie, et les poumons chez les vertébrés (Figure 1). Ces feuillets sont déterminés au début du développement avec toutefois quelques exceptions quant aux types de tissus qu'ils produisent. Les crêtes neurales des vertébrés par exemple, d'origine ectodermique, donnent non seulement du tissu nerveux, mais aussi certains éléments du squelette qui sont généralement issus du mésoderme.



Fig. 1.16 Gastrulation chez l'oursin. La gastrulation transforme la blastula sphérique en une structure comportant en son milieu un tube, l'archentéron, futur tube digestif. La partie gauche de l'embryon a été retirée.





Fig. 1.17 Le fœtus humain change de forme au fil de sa croissance. À partir du moment où le plan corporel est bien établi, à 8 semaines, la longueur du fœtus augmente d'un rapport 10 jusqu'à la naissance (en haut), alors que les proportions relatives de la tête et du reste du corps diminuent (en bas). La conséquence est un changement des proportions et de la forme du fœtus. Barre d'échelle = 10 cm.

D'après Moore, K.L. : The Developing Human, 1983. Saunders.



cellules de ces feuillets acquièrent des identités distinctes si bien que finalement émergent des patrons spatiaux organisés de cellules différenciées, tels l'arrangement de la peau, des muscles et du cartilage dans les membres en formation, les arrangements de neurones dans le système nerveux.

Le deuxième processus de développement important est le changement de forme, ou morphogenèse (discuté Chapitre 9). Les embryons subissent des changements remarquables de leur forme spatiale, il suffit de penser à l'anatomie complexe de structures telles que les mains et les pieds. À certains stades du développement, il y a des changements de forme caractéristiques et spectaculaires, le plus frappant étant la gastrulation. Presque tous les embryons animaux subissent la gastrulation, au cours de laquelle l'endoderme et le mésoderme migrent à l'intérieur, le tube digestif apparaît, et le plan principal du corps émerge. Au cours de la gastrulation, les cellules à l'extérieur de l'embryon pénètrent à l'intérieur et, chez des espèces telles que l'oursin, la gastrulation transforme une blastula sphérique et creuse en une gastrula avec un tube en son centre, le futur tube digestif (Fig. 1.16). La morphogenèse chez les embryons des espèces animales peut aussi impliquer une importante migration cellulaire. La plupart des cellules du visage humain, par exemple, dérivent de cellules qui ont migré à partir d'un tissu, les crêtes neurales, apparaissant à la face dorsale de l'embryon. La morphogenèse peut également impliquer la mort cellulaire programmée, appelée **apoptose**, responsable par exemple, de la séparation des doigts et des orteils à partir d'un tissu initialement constitué en plaque compacte.

Le troisième processus de développement concerne la **différenciation cellulaire**, au cours duquel les cellules deviennent structuralement et fonctionnellement différentes les unes des autres, aboutissant à des types cellulaires distincts, telles que des cellules du sang, du muscle ou de la peau. La différenciation est un processus graduel, les cellules subissant plusieurs divisions entre le moment où elles commencent à se différencier et celui où elles sont totalement différenciées (quand beaucoup de types cellulaires cessent complètement de se diviser), ceci est discuté Chapitre 8. Chez l'espèce humaine, le zygote donne naissance à des centaines de types cellulaires bien distincts.

Le patron de la mise en place des structures corporelles et la différenciation des cellules sont très étroitement liés, il suffit de considérer la différence entre les bras et les jambes humaines. Les deux contiennent exactement les mêmes types de cellules du muscle, du cartilage, de l'os, de la peau, et ainsi de suite, mais le patron selon lequel elles sont disposées diffère nettement. C'est avant tout lui qui fait que les humains ne ressemblent ni aux éléphants ni aux chimpanzés.

Le quatrième processus est la **croissance**, l'augmentation de la taille. En général, la croissance est faible au cours du développement embryonnaire précoce, le modèle de base et la forme de l'embryon étant établis à petite échelle, toujours moins d'un millimètre. La croissance ultérieure peut être réalisée de différentes manières : multiplication cellulaire, augmentation de la taille des cellules, dépôt de matériaux extracellulaires comme dans l'os, par exemple. La croissance peut également être morphogène, les différences de taux de croissance entre les organes ou les parties du corps pouvant créer des changements dans la forme globale de l'embryon (Fig. 1.17), comme cela sera vu plus en détail dans le chapitre 13.

Ces quatre processus de développement ne sont ni indépendants, ni strictement séquentiels. Globalement, la mise en place précoce du patron du développement détermine des différences entre les cellules, ce qui conduit aux changements de forme, à la différenciation cellulaire et la croissance. Mais dans tout système en développement, la séquence des événements présente de nombreux détours.

1.9 Le comportement cellulaire fait le lien entre action des gènes et processus du développement

L'expression des gènes dans les cellules conduit à la synthèse des protéines responsables des propriétés et du comportement spécifiques des cellules, qui déterminent à leur tour le déroulement du développement embryonnaire. Les profils passés et en cours de l'activité génique confèrent à un moment donné, un certain état, ou une identité, à la cellule, ce qui se reflète dans son organisation moléculaire, en particulier dans le type de protéines présentes. Les cellules embryonnaires et leurs descendants subissent de nombreux changements d'état au cours du développement. D'autres catégories de comportement cellulaire seront abordées, comme la communication intercellulaire ou **signalisation cellule-cellule**, les changements de forme, le mouvement, la prolifération, et la mort cellulaires.

Changer les profils d'activité des gènes au cours du développement précoce est essentiel pour la mise en place de l'organisation corporelle. En donnant leur identité aux cellules, ils déterminent leur comportement futur et conduisent en fait à leur différenciation finale. Comme il a été vu dans le cas de l'induction par l'organisateur de Spemann, la capacité des cellules à influencer réciproquement leur destin, en produisant des signaux et en y répondant, est cruciale pour le développement. En répondant, par exemple, à des signaux par un mouvement ou un changement de forme, les cellules génèrent des forces physiques provoquant une morphogenèse (Fig. 1.18). Le creusement d'un feuillet cellulaire en un tube, comme cela se produit chez le xénope et d'autres vertébrés lors de la formation du tube neural (Encart 1A), résulte de forces contractiles générées par les cellules qui changent de forme à certains endroits au sein du feuillet. À la surface des cellules, la présence de protéines adhésives nommées molécules d'adhérence cellulaire assurent plusieurs fonctions : la cohésion des cellules dans les tissus, la détection de la nature de la matrice extracellulaire environnante, le guidage des cellules en migration telles que les cellules des crêtes neurales des vertébrés qui quittent le tube neural pour former des structures ailleurs dans le corps.

Les processus intervenant dans le développement peuvent donc être décrits et expliqués par la façon dont les cellules se comportent, isolées et en groupe. Puisque les structures finales créées par le développement sont elles-mêmes formées de cellules, expliquer et décrire au niveau cellulaire peut rendre compte de la manière dont se forment les structures adultes.

Le développement pouvant être compris au niveau cellulaire, le contrôle du développement par les gènes peut être posé sous une forme plus précise, en cherchant comment les gènes contrôlent le comportement des cellules. Les nombreux moyens par lesquels une cellule peut se comporter fournissent le lien entre l'activité génique et la morphologie de l'animal adulte, l'aboutissement ultime du développement. La biologie cellulaire fournit les moyens par lesquels le génotype se trouve traduit en phénotype.

1.10 Les gènes contrôlent le comportement cellulaire en déterminant les protéines à synthétiser

Les protéines produites par une cellule déterminent en grande partie ce qu'elle peut faire. L'hémoglobine permet aux globules rouges de transporter l'oxygène, les cellules qui bordent l'intestin sécrètent des enzymes digestives spécialisées, et les cellules des muscles squelettiques peuvent se contracter grâce à des structures contractiles composées des protéines, myosine, actine et tropomyosine et des protéines spécifiques du muscle requises pour assurer une fonction musculaire correcte. Toutes sont des protéines spécialisées et non impliquées dans les activités de « ménage » communes à toutes les cellules pour assurer leur survie et leur fonctionnement. Les activités de ménage comprennent la production d'énergie et les voies métaboliques impliquées dans la dégradation et la synthèse de molécules nécessaires à la vie de la cellule. Bien que les protéines de ménage de ces différentes cellules présentent des variations qualitatives et quantitatives, elles ne constituent pas des acteurs importants dans le développement, dans lequel seules sont concernées les protéines qui rendent les cellules différentes les unes des autres et qui sont souvent appelées protéines **tissus-spécifiques**.

Les gènes contrôlent le développement en spécifiant avant tout quelles protéines sont produites, dans quelle cellule, et à quel moment. Ils sont ainsi des participants



Fig. 1.18 Contraction localisée de certaines cellules d'un feuillet cellulaire pouvant conduire au creusement de celui-ci. La contraction de la zone apicale de cellules alignées, en raison de modifications de leurs structures internes, produit un sillon dans un feuillet épidermique.



passifs du développement comparés aux protéines qu'ils codent, celles-ci étant les agents qui déterminent directement le comportement des cellules, avec les gènes qui seront exprimés. Pour produire une protéine donnée, son gène doit être activé et transcrit (transcription) en ARN messager (ARNm), processus nommé expression génique. L'ARNm doit ensuite être traduit (traduction) en protéine. L'initiation de la transcription ou activation d'un gène, implique la combinaison de protéines régulatrices de gènes spécialisées se fixant sur la région de contrôle de ces derniers. Cette région comprend des régions cis-régulatrices dans l'ADN (cis renvoie simplement au fait que la région régulatrice est sur la même molécule d'ADN que le gène qu'elle contrôle). Ces régions cis-régulatrices sont souvent modulaires, et pour de nombreux gènes du développement, différents modules cis-régulateurs contrôlent le moment de leur expression et le tissu où ils sont exprimés.

La transcription et la traduction sont toutes deux soumises à plusieurs niveaux de contrôle, la traduction ne suivant pas automatiquement la transcription. La Figure 1.19 montre les principales étapes de l'expression des gènes au cours desquelles la production d'une protéine peut être contrôlée. Même une fois le gène transcrit, l'ARNm peut par exemple être dégradé avant d'être exporté du noyau, et si un ARNm atteint le cytoplasme, sa traduction peut être empêchée ou retardée. Dans les zygotes de nombreuses espèces, la traduction de l'ARNm préformé peut être bloquée jusqu'après la fécondation. L'ARNm peut également être la cible de microARN (miARN), courts ARN non codant pouvant bloquer la traduction en inactivant l'ARNm (Encart 6C). Certains miARN sont connus pour être impliqués dans la régulation des gènes du développement. La maturation de l'ARN constitue un autre processus pour déterminer les protéines produites. Chez les organismes eucaryotes, tous les organismes autres que les bactéries et les archées, les ARN issus de la transcription de nombreux gènes, peuvent être coupés et épissés de différentes façons, cet épissage alternatif donnant deux ou plus ARNm différents. Plusieurs protéines distinctes, avec des propriétés différentes, peuvent ainsi être produites à partir d'un seul gène.

Même si un gène a été transcrit et l'ARNm traduit, la protéine peut ne pas être immédiatement fonctionnelle. De nombreuses protéines nouvellement synthétisées requièrent en effet une **modification post-traductionnelle** avant d'être biologiquement actives. Une modification très courante subie par des protéines destinées à la membrane cellulaire ou la sécrétion, est l'addition de chaînes latérales d'hydrates de carbone, ou **glycosylation**. Des modifications post-traductionnelles réversibles, telles que la phosphorylation, peuvent également modifier de façon significative la fonction des protéines. Ensemble, l'épissage alternatif de l'ARN et la modification post-traductionnelle indiquent que le nombre de protéines fonctionnellement différentes pouvant être produites est nettement supérieur à celui qu'annoncerait le nombre de gènes codant des protéines. La localisation de nombreuses protéines à un endroit particulier de la cellule, par exemple le noyau, est essentielle pour leur permettre de remplir leur fonction.

Fig. 1.19 Expression génique et synthèse protéique. Un gène codant une protéine comprend une région codante, portion d'ADN contenant les instructions pour produire une protéine, et des séquences d'ADN adjacentes qui agissent comme une région contrôle. La région contrôle comprend d'une part la région du promoteur, à la laquelle les facteurs de transcription généraux et l'enzyme qui polymérise l'ARN se fixent pour débuter la transcription, et d'autre part une région régulatrice en cis, consistant en un ou deux modules auxquels d'autres facteurs de transcription se fixent pour activer ou inhiber les gènes. Cette deuxième région de contrôle peut se situer à quelques centaines de paires de base du promoteur. Quand le gène est activé, la séquence d'ADN est transcrite pour produire un ARN (1). L'ARN formé par la transcription est épissé pour éliminer des introns et des régions non codantes en début de gène (en jaune), et traité dans le noyau (2) pour produire un ARNm. Ce dernier est exporté du noyau au cytoplasme (3) pour la traduction en protéine au niveau des ribosomes (4). Le contrôle de l'expression génique et de la synthèse des protéines se produit essentiellement au niveau de la transcription mais peut apparaître à des temps plus tardifs. Par exemple l'ARNm peut être dégradé avant d'être traduit, ou s'il n'est pas traduit aussitôt, il peut être stocké dans le cytoplasme sous une forme inactive pour une traduction ultérieure. L'ARNm peut aussi être ciblé par un microARN spécifique, ce qui bloque la traduction. Certaines protéines requièrent une étape supplémentaire de maturation post-traductionnelle (5) pour devenir biologiquement actives. Une modification post-traductionnelle courante consiste, comme il est montré ici, en l'addition de chaînes latérales carbohydratées (glycosylation).

Il est intéressant de savoir combien de gènes dans l'ensemble du génome, sont des gènes du développement, c'est-à-dire des gènes spécifiquement requis pour le développement embryonnaire. Ceci est difficile à estimer. Pour le développement précoce de la drosophile, au moins 60 gènes sont directement impliqués dans la mise en place de l'organisation corporelle jusqu'à ce que l'embryon soit divisé en segments. Chez Caenorhabditis, au moins 50 gènes sont nécessaires pour spécifier une petite structure reproductrice connue sous le nom de la vulve. C'est un très petit nombre comparé aux milliers de gènes qui sont actifs au même moment. Certains d'entre eux sont essentiels car nécessaires au maintien de la vie, mais ils ne fournissent que peu ou pas d'informations influençant le déroulement du développement. De nombreux gènes changent leur activité de façon systématique au cours du développement, ce qui suggère qu'ils pourraient être des gènes du développement. Le nombre total de gènes chez le nématode et la drosophile est d'environ 19 000 et 15 000, respectivement, dont probablement quelques milliers impliqués dans le développement. Une analyse systématique de la majeure partie du génome du nématode suggère qu'environ 9 % des gènes, soit 1 722 sur 19 000, sont impliqués dans le développement.

Les gènes du développement codent normalement des protéines impliquées dans la régulation du comportement cellulaire tels que des récepteurs, des protéines assurant la signalisation intracellulaire, ou intercellulaire comme les facteurs de croissance, des protéines de régulation des gènes. Beaucoup de ces gènes, en particulier ceux codant des récepteurs et des molécules de signalisation, sont utilisés tout au long de la vie d'un organisme, mais d'autres ne sont actifs que pendant le développement embryonnaire. Certaines des techniques utilisées pour savoir où et quand un gène est actif sont décrites dans les encarts 1D et 3B. La production d'une protéine peut également être empêchée en entravant l'expression d'un gène donné. Ceci peut être effectué en utilisant des ARN anti-sens, petites molécules d'ARN d'environ 25 nucléotides complémentaires à la séquence d'une partie de l'ARNm. De tels ARN anti-sens peuvent bloquer la fonction des gènes en se liant à leurs ARNm. Des molécules d'ARN artificiel, les morpholinos, sont utilisées pour leur stabilité supérieure à celle de l'ARN normal. L'expression des gènes peut être bloquée par une autre technique, l'interférence à ARN (ARNi). Elle fonctionne de facon semblable mais utilise un type différent de petit ARN, nommé petit ARN interférent (pARNi), en mettant à profit les propres voies métaboliques de la cellule pour dégrader les ARNm. Ces techniques sont détaillées dans l'Encart 6B.

1.11 L'expression des gènes du développement est sous un contrôle strict

Toutes les cellules somatiques de l'embryon dérivent du zygote à la suite de cycles successifs de divisions cellulaires mitotiques. Ainsi, à de rares exceptions près, elles contiennent toutes des informations génétiques identiques, celles du zygote. John Gurdon a montré, par une série capitale d'expériences sur le xénope, que l'information génétique n'est pas perdue lors de la différenciation. Dans ces expériences destinées à tester les capacités des noyaux à assurer le développement normal, le noyau de cellules différenciées a été placé dans des ovules dont le noyau avait été détruit. Des têtards furent obtenus dans de nombreux cas, et dans quelques cas même des grenouilles adultes, montrant que les cellules différenciées contiennent toujours l'information génétique requise pour produire un animal complet (Fig. 1.20). C'est le principe de l'équivalence génétique. Les différences entre les cellules doivent ainsi être générées par des différences d'activité génique qui conduisent à la synthèse de protéines variées. C'est le principe de l'expression génique différentielle. Pour ce travail, John Gurdon reçut le prix Nobel en 2012, conjointement avec le biologiste japonais Shiya Yamanaka pour sa recherche sur les cellules souches de souris (sujet abordé Chapitre 8).

L'enjeu central du développement est donc d'activer ou d'inhiber les bons gènes, dans les bonnes cellules, au bon moment. Comme cela sera vu tout au long de cet ouvrage, les gènes ne fournissent pas un plan de développement, mais un ensemble d'instructions. Les régions *cis*-régulatrices sont des éléments clés dans la régulation de la lecture de ces instructions en étant associées à des gènes du développement et à des gènes pour des protéines spécialisées (voir Fig. 1.19). Ceux-ci sont sollicités par des protéines régulatrices de gènes, qui activent ou inhibent les gènes en activant ou réprimant la transcription. Certaines protéines régulatrices de gènes, nommées

ENCART 1D Observer l'expression des gènes chez l'embryon



Afin de comprendre comment l'expression des gènes guide le développement, il est essentiel de savoir exactement où et quand certains gènes sont actifs. Les gènes sont activés et inhibés pendant le développement et les profils d'expression génique évoluent sans cesse. Plusieurs techniques puissantes peuvent montrer où un gène est exprimé dans l'embryon.

Un ensemble de techniques utilise l'hybridation in situ d'acide nucléique pour détecter l'ARNm transcrit à partir d'un gène. Si une sonde d'ADN ou d'ARN est complémentaire en séquence à un ARNm transcrit dans la cellule, elle s'appariera précisément (hybridation) avec les bases de l'ARNm (Figure 1). Une sonde d'ADN peut donc être utilisée pour localiser l'ARNm complémentaire sur une coupe de tissu ou chez un embryon entier. Pour être détectée, la sonde doit être marquée de manières variées, avec un isotope radioactif, un marqueur fluorescent (hybridation fluorescente in situ ou FISH, pour Fluorescent In Situ Hybridization), ou une enzyme. Les sondes radiomarquées sont détectées par radioautographie, alors que les sondes marquées avec des composés fluorescents sont observées par microscopie à fluorescence. Les sondes marquées par une enzyme sont détectées grâce à la conversion, par l'enzyme, d'un substrat incolore en un produit coloré (Fig. 5.37a et b). Le marquage avec des composés fluorescents ou des enzymes a l'avantage par rapport à un marquage radioactif de permettre la détection simultanée de l'expression de plusieurs gènes distincts en marquant les sondes différentes avec des marqueurs colorés distincts. Cela évite également de travailler avec des produits chimiques radioactifs.

Les protéines peuvent aussi être détectées *in situ* par immunomarquage avec des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine. Les anticorps peuvent être révélés directement *via* un composé coloré ou une enzyme, ou, plus habituellement, l'anticorps spécifique de la protéine est détecté par une seconde étape avec un anticorps anti-immunoglobuline marqué soit avec un fluorochrome (comme illustré ici) soit une enzyme (voir Fig. 2.34). La figure 2 montre une coupe du tube neural d'un embryon de poulet au stade 16 (environ 2 à 2,75 jours après la ponte) où est révélée par immunomarquage l'expression de facteurs de transcription distinguant les parties dorsale et ventrale du tube neural. Cette image a été obtenue par le traitement séparé de coupes sériées pour chacun des cinq facteurs de transcription, puis par la fusion des

Figure 1

images. Dans un premier temps, des anticorps spécifiques des protéines ont été déposés sur les coupes, puis les complexes facteur de croissance/anticorps spécifique ont été visualisés par l'application d'anticorps secondaires anti-immunoglobuline marqués avec des fluorochromes (violet, Foxa2 ; rouge, Nkx2.2 ; jaune, Olig2 ; vert, Pax6 ; bleu, Pax7). Ces techniques de marquage *in situ*, que ce soit pour l'ARN ou la protéine, ne peuvent être appliquées qu'à des embryons fixés et des coupes de tissus.

Le profil et la chronologie de l'expression génique peuvent également être suivis en insérant, par des techniques transgéniques, un gène « rapporteur » chez un animal. Le gène rapporteur codant une protéine facilement détectable, est placé sous le contrôle d'un promoteur approprié qui activera l'expression de la protéine à un moment et dans un lieu particuliers. Un gène rapporteur couramment utilisé est la séquence lacZ codant pour l'enzyme bactérienne β -galactosidase. La présence de l'enzyme peut être détectée en traitant l'échantillon fixé avec un substrat modifié, avec lequel l'enzyme réagit pour donner un produit de couleur bleue (voir Fig. 5.28) ou en utilisant un anticorps spécifique de la β -galactosidase marqué par un fluorochrome.

D'autres gènes rapporteurs très couramment utilisés codent de petites protéines fluorescentes, telles que la protéine fluorescente verte (GFP pour *Green Fluorescent Protein*). Isolées à partir de méduses et autres organismes marins, elles émettent une fluorescence dans des couleurs variées. Sans danger pour les cellules vivantes, ces protéines sont extrêmement utiles et facilement repérables en illuminant les cellules, les embryons, ou même les animaux entiers avec une lumière d'une longueur d'onde appropriée. L'expression des gènes peut donc être visualisée et suivie dans les cellules et les embryons vivants (voir Fig. 3.32 et 5.37c). O. Shimomura, M. Chalfie et R. Tsien reçurent le prix Nobel de Chimie en 2008 pour leur découverte de la GFP et d'autres protéines fluorescentes et leur utilisation en imagerie *in vivo*.



Figure 2

Photographie aimablement fournie par G. Le Dréau et E. Martí. Issue de Le Dreau, G., Marti, E. : Dev. Neurobiol. 2012, **72 :** 1471-1481



facteurs de transcription, agissent en se fixant directement sur des sites de contrôle sur l'ADN (voir Fig. 1.19), alors que d'autres, **co-activateurs** ou **co-répresseurs**, interagissent avec des facteurs de transcription déjà liés à l'ADN.

Les gènes du développement sont hautement régulés pour être activés uniquement au bon moment et au bon endroit lors du développement, ce qui en est une caractéristique fondamentale. Pour ce faire, ces gènes ont en général des régions *cis*-régulatrices nombreuses et complexes composées d'un ou de plusieurs modules. Chaque module contient des sites multiples de liaison pour différents facteurs de transcription, et c'est la combinaison précise des facteurs se fixant qui détermine si le gène est activé ou réprimé. Un module aura en moyenne des sites de liaison pour quatre à huit facteurs de transcription différents, et ces facteurs lieront souvent à leur tour d'autres protéines co-activatrices ou co-répressives.

La nature modulaire de la région régulatrice signifie que chaque module peut fonctionner quelque peu indépendamment. Cela signifie qu'un gène avec plus d'un module régulateur peut en général répondre tout à fait différemment à des combinaisons distinctes de signaux, et peut ainsi être exprimé à différents moments et endroits au sein de l'embryon en réponse aux signaux de développement. Des gènes différents peuvent avoir le même module régulateur, ce qui signifie en général qu'ils sont exprimés ensemble, ou bien des gènes différents peuvent avoir des modules qui contiennent une partie seulement des sites de liaison en commun, présentant des différences subtiles dans le temps ou le lieu de leur expression. Ainsi, les gènes d'un organisme sont liés à des réseaux d'expression interdépendants complexes grâce aux modules de leurs régions cis-régulatrices et aux protéines qui les lient. Des exemples courants de cette régulation sont les boucles de rétrocontrôle positif et négatif, dans lesquelles un facteur de transcription favorise ou réprime respectivement l'expression d'un gène dont le produit maintient l'expression de ce gène (Fig. 1.21). En effet, de vastes réseaux d'interactions de gènes pour différents stades de développement ont été décrits pour les animaux tels que l'oursin (voir Chapitre 6).

Comme toutes les étapes clés du développement reflètent les changements dans l'activité des gènes, il serait tentant de penser le développement simplement en termes de mécanismes contrôlant leur expression. Mais ce serait une grave erreur, l'expression des gènes étant seulement la première étape d'une cascade de processus cellulaires qui conduit *via* la synthèse de protéines à des changements dans le comportement cellulaire et dirige ainsi le cours du développement embryonnaire. Les protéines sont les machines qui guident le développement. Raisonner seulement en termes de gènes, c'est ignorer les aspects cruciaux de la biologie cellulaire, tels que le changement dans la forme des cellules qui peut être initié à plusieurs étapes en aval de l'activité des gènes. En fait, la séquence complète des événements, de l'expression des gènes au comportement altéré des cellules, a été décrite dans très peu de cas. La voie menant de l'activité génique à une structure telle que la main à cinq doigts est tortueuse. Les progrès accomplis seront décrits Chapitre 11.

Fig. 1.20 Les cellules différenciées contiennent encore toute l'information génétique nécessaire pour engendrer un organisme complet. Une irradiation aux rayons ultraviolets rend non fonctionnel le noyau haploïde de l'ovocyte non fécondé de xénope. Un noyau diploïde prélevé sur une cellule de la peau adulte est transféré dans l'ovocyte énucléé, et permet d'assurer le développement d'un embryon au moins jusqu'au stade têtard.





Fig. 1.21 Boucle de rétrocontrôle génétique simple. En haut : le gène 1 est activé par un facteur de transcription activateur (en vert). La protéine (en rouge) active le gène 2. La protéine produite par le gène 2 (en bleu) non seulement agit sur des cibles en aval, mais active également le gène 1, constituant une boucle de rétrocontrôle positif qui maintient activés les gènes 1 et 2, même en l'absence de l'activateur initial. En bas : une boucle de rétrocontrôle négatif apparaît quand le produit du gène 4, à la fin de la voie de synthèse, peut inhiber le premier gène (gène 3), inhibant ainsi la transcription des deux gènes. La flèche indique l'activation, le tiret l'inhibition.

Fig. 1.22 Distinction entre destinée cellulaire, détermination et spécification. Sur ce schéma idéalisé, les régions A et B se différencient en deux types de cellules, représentés par des hexagones et des carrés. La carte des destinées (schémas de gauche) montre ce que les cellules devraient donner dans un développement normal. Si des cellules de la région B sont transplantées dans la région A et donnent des cellules de type A, la destinée de la région B n'a pas encore été déterminée (schémas centre gauche). Par contre, si des cellules de la région B sont déjà déterminées au moment de leur transplantation dans la région A, elles donneront des cellules de type B (schémas centre droit). Même si les cellules B ne sont pas déterminées, elles peuvent être spécifiées en ce sens que cultivées isolément du reste de l'embryon, elles donneront des cellules B (schéma à droite).

1.12 Le développement est progressif et la destinée des cellules se détermine à des moments différents

Avec la progression du développement, la complexité de l'organisation de l'embryon augmente beaucoup par rapport à celle du zygote, comme cela est déjà admis dans le principe d'« épigenèse » d'Aristote, décrit *supra* dans ce chapitre. Des types cellulaires nombreux et variés sont formés, des patrons d'organisation spatiale émergent et des changements morphologiques majeurs apparaissent. Tout cela se produit plus ou moins progressivement, en fonction de l'organisme considéré. Mais, en général, l'embryon est d'abord partagé en quelques grandes régions, tels que les futurs feuillets embryonnaires (mésoderme, ectoderme et endoderme). Par la suite, la destinée des cellules au sein de ces régions se détermine de plus en plus finement. La **détermination** implique un changement stable dans l'état interne de la cellule, la modification du profil de l'activité génique étant considérée être l'étape initiale conduisant au changement des protéines produites par la cellule. Des cellules mésodermiques variées, par exemple, deviennent finalement déterminées en cellules musculaires, cartilagineuses, osseuses, en fibroblastes de tissu conjonctif ou en cellules du derme de la peau.

Un concept important dans le processus de détermination de la cellule est celle du **lignage**, la descendance directe d'une cellule donnée. Une fois la cellule déterminée, ce changement stable est transmis à ses descendants. Le lignage d'une cellule a ainsi des conséquences importantes sur le type de cellule que celle-ci peut éventuellement devenir. Par exemple, une fois l'ectoderme déterminé, ses cellules ne donneront pas des tissus endodermiques, ou *vice versa*. Dans certains organismes, tels que *Caenorhabditis*, le corps entier est dérivé du zygote selon des lignages très stricts (Chapitre 6), mais chez la plupart des organismes, le sort des cellules n'est pas déterminé par un lignage fixe, invariant.

Il est important de bien comprendre la distinction entre le devenir normal d'une cellule à un stade donné et son état de détermination. La **destinée** d'un groupe de cellules décrit simplement ce qu'elles vont normalement donner. En marquant les cellules de l'embryon précoce, on peut repérer, par exemple, quelles cellules ectodermiques donnent normalement le système nerveux, et parmi celles-ci, lesquelles en particulier vont donner la partie nerveuse de la rétine de l'œil. Dans ces types d'expériences, on obtient une « carte des territoires présomptifs » de l'embryon (voir Section 3.7). Cependant, la carte ne signifie nullement que ces cellules ne peuvent donner que de la rétine, ou sont déjà engagées, ou déterminées, à le faire dans l'embryon précoce.

Les cellules d'un groupe sont dites **spécifiées** si, lorsqu'isolées et mises en culture hors de l'embryon, dans un environnement neutre tel qu'un milieu de culture simple, elles se développent plus ou moins en fonction de leur destinée normale (Fig. 1.22).



Par exemple, les cellules du pôle animal de la blastula d'amphibien (Encart 1A) spécifiées pour former de l'ectoderme formeront, isolées, de l'épiderme. Les cellules qui sont « spécifiées » dans ce sens technique ne sont pas encore « déterminées », car l'influence d'autres cellules peut changer leur destinée normale. Si du tissu du pôle animal est mis en contact avec des cellules du pôle végétatif, une partie de ce tissu animal formera du mésoderme au lieu de l'épiderme. À un stade ultérieur du développement, cependant, les cellules de la région animale sont devenues déterminées comme ectoderme et leur destinée ne peut alors plus être changée. Des tests de spécification reposent sur la culture du tissu dans un environnement neutre dépourvu de signaux d'induction, ce qui est souvent difficile à réaliser, alors qu'il est beaucoup plus facile de tester la détermination.

L'état de détermination des cellules à n'importe quel stade du développement peut être démontré par des expériences de greffe. Au stade blastula de l'embryon d'amphibien, les cellules ectodermiques donnant normalement l'œil, greffées sur le côté de l'embryon, se développent en fonction de leur nouvelle position, c'est-à-dire en cellules mésodermiques. À ce stade précoce, leur potentiel de développement est beaucoup plus grand que leur destinée normale. Cependant, si la même opération est effectuée à un stade ultérieur, alors les cellules de la future zone des yeux formeront des structures typiques de l'œil (Fig. 1.23). Au stade précoce, les cellules n'étaient pas encore déterminées comme des cellules oculaires potentielles, alors que plus tard, elles le sont devenues, et ainsi le développement du greffon est **autonome**, indépendant de son nouvel emplacement.

Une caractéristique générale du développement est que la détermination des cellules est moins stricte dans l'embryon précoce qu'à un stade ultérieur, le potentiel de développement des cellules se restreignant avec le temps. La détermination impliquerait un changement dans les gènes exprimés par la cellule, et ce changement fixerait ou limiterait le destin des cellules, diminuant ainsi ses options de développement.

Comme cela a déjà été vu, même au stade deux cellules, les cellules de l'embryon d'oursin ne semblent pas être déterminées. Chacune a le potentiel de former une nouvelle larve complète (Section 1.3). Ces embryons pour lesquels le potentiel de développement des cellules est beaucoup plus grand que celui indiqué par leur destinée normale, sont dits capables de **régulation** ou ayant un **développement à**



Fig. 1.23 Détermination de la région de l'œil au fil du temps chez l'embryon d'amphibien. Si la région de la gastrula qui devrait normalement donner un œil est greffée dans la région du tronc d'une neurula (au milieu), le greffon donne des structures typiques du site d'implantation site, telles que de la chorde et des somites. Toutefois, si la région de l'œil d'une neurula est greffée au même endroit (en bas), elle donne une structure apparentée à un œil, puisqu'à ce stade tardif elle a été déterminée.



Fig. 1.24 La fusion d'embryons de souris donne naissance à une chimère. Si un embryon au stade 4 cellules, issu d'une souche pigmentée de souris, est fusionné avec un embryon similaire d'une souche non pigmentée, l'embryon résultant générera un animal chimère, avec un mélange de cellules pigmentées et non pigmentées. La distribution des différentes cellules sur la peau fournit un pelage en patchwork. régulation. Les embryons de vertébrés sont capables d'une forte régulation. Par contre, les embryons pour lesquels les cellules se développent uniquement selon leur destinée initiale à partir d'un stade précoce sont nommés mosaïques. Le terme mosaïque a une longue histoire (Section 1.3). Il est maintenant utilisé pour décrire les embryons qui se développent comme si leur mode de développement futur était établi très tôt, même dans le zygote, chez lequel les différentes molécules sont réparties selon une mosaïque. Ces déterminants cytoplasmiques se distribuent au moment de la segmentation entre les différentes cellules selon un mode constant qui détermine ainsi très précocement la destinée du lignage des cellules. Les différentes parties de l'embryon se développent ensuite tout à fait indépendamment les unes des autres. Caenorhabditis, abordé Chapitre 6, est un exemple d'embryon avec de fortes proportions de développement mosaïque. Dans ces embryons les interactions cellulaires sont plutôt limitées. La démarcation entre les stratégies des développements à régulation et mosaïque n'est cependant pas toujours nette, et reflète en partie le moment où la détermination se produit, celle-ci étant beaucoup plus précoce dans les systèmes mosaïques.

La différence entre les embryons à régulation et mosaïques reflète également l'importance relative des interactions cellulaires dans chacun de ces types. Pour apparaître, la régulation nécessite des interactions cellulaires, car sinon comment un développement normal pourrait-il avoir lieu et comment reconnaître et réparer des défauts ? Un embryon purement mosaïque ne devrait pas en principe, avoir recours à de telles interactions. Mais il n'existe apparemment pas d'embryons de ce type.

Sous-jacent aux phénomènes de développement de type mosaïque et à régulation, se pose la question de savoir si les effets d'un gène exprimé sont purement limités à la cellule qui exprime ce gène, ou s'ils influencent ou sont influencés par les autres cellules qui ne l'expriment pas. Les effets limités à la cellule exprimant le gène sont dits à **autonomie cellulaire**, tandis que si l'expression du gène dans une cellule a un effet sur d'autres cellules, celui-ci correspond à un effet cellulaire **non autonome**. Un effet non autonome est en général dû au produit d'un gène tel qu'une protéine de signalisation intercellulaire sécrétée par une cellule et agissant sur d'autres, tandis que les effets à autonomie cellulaire sont dus à des protéines telles que des facteurs de transcription agissant uniquement à l'intérieur de la cellule qui les produit.

Les effets génétiques à autonomie cellulaire *versus* non autonomes peuvent être testés chez des souris générées grâce à la fusion de deux embryons très précoces de constitutions génétiques distinctes (Fig. 1.24). La souris résultante sera une **chimère**, mosaïque de cellules avec des constitutions génétiques différentes. Si les embryons précoces de souris au pelage brun et blanc sont fusionnés, la souris résultante a des taches distinctes brunes et blanches dans son pelage, ce qui reflète des amas de cellules de la peau dérivées des embryons bruns et blancs, respectivement. Les cellules brunes produisent encore le pigment brun une fois mises dans une souris blanche, sans avoir aucun effet sur les cellules blanches ; la pigmentation est ainsi un caractère à autonomie cellulaire.

1.13 Les interactions inductrices rendent les cellules différentes les unes des autres

Créer des cellules différentes les unes des autres est au centre du développement. A de nombreux moments des signaux issus d'un groupe cellulaire influencent le développement d'un autre groupe adjacent. Il s'agit de l'**induction**, dont l'exemple classique est l'action de l'organisateur de Spemann chez les amphibiens (Section 1.4). Les signaux inducteurs peuvent être très localisés ou atteindre plusieurs cellules voire un grand nombre. Les signaux inducteurs de l'organisateur des amphibiens affectent de nombreuses cellules, alors que d'autres signaux inducteurs issus d'une seule cellule peuvent être transmis à une cellule immédiatement voisine. Les inductions **permissives** et **instructives** sont les deux types à distinguer. Les inductions permissives apparaissent quand une cellule n'a qu'un seul type de réponse à un signal, et quand est atteint un niveau donné du signal. En revanche dans une induction instructive, les cellules réagissent différemment à des concentrations variées du signal. Des molécules de signalisation « antagonistes », qui bloquent une induction en empêchant par exemple les signaux inducteurs d'atteindre les cellules, ou en se fixant sur des récepteurs à leur surface, sont également importantes dans le contrôle du développement.

Les signaux inducteurs sont transmis entre les cellules de trois façons principales (Fig. 1.25) : (1) le signal, en général une protéine, diffuse à travers l'espace extracellulaire sous forme de molécule sécrétée ; (2) les cellules communiquent entre elles directement au moyen de molécules situées à leur surface, en général également des protéines. Dans ces deux cas, le signal est habituellement reçu par des récepteurs protéiques de la membrane cellulaire puis relayé *via* des voies de signalisation intracellulaire pour produire la réponse de la cellule ; (3) le signal passe directement d'une cellule à l'autre. Ceci se fait, dans la plupart des cellules animales, à travers des jonctions communicantes, pores de protéines spécialisées des membranes plasmiques contiguës fournissant des canaux de communication directs laissant passer des petites molécules entre les cytoplasmes de cellules adjacentes. Les cellules végétales sont reliées par des plasmodesmes, canaux cytoplasmiques permettant le passage direct de très grosses molécules. Certaines petites molécules qui agissent comme des signaux extracellulaires au cours du développement des animaux et des plantes peuvent passer à travers la membrane plasmique.

Dans le cas d'une signalisation par une protéine diffusible, ou par contact direct entre deux protéines à la surface de cellules adjacentes, le signal est reçu au niveau de la membrane cellulaire par la liaison de la protéine de signalisation à son récepteur. Pour modifier l'expression des gènes dans le noyau ou le comportement cellulaire, cette information doit traverser la membrane et être transmise à l'intérieur de la cellule. Ce processus nommé **transduction du signal** ou **signalisation intracellulaire**, est assuré par des molécules de signalisation intracellulaire qui sont activées lorsque la protéine de signalisation extracellulaire se fixe sur son récepteur. L'Encart 1E présente de manière très simplifiée les différents types de voies de signalisation intracellulaires initiées par les protéines de signalisation intercellulaires couramment utilisées dans le développement. Des schémas plus détaillés de voies particulières sont présentés tout au long de cet ouvrage, où ces signaux et voies de signalisation intracellulaires seront maintes fois rencontrés chez des espèces et dans des situations de développement variées.

Dans la cellule, le signal progresse grâce aux interactions des protéines de signalisation. La phosphorylation, qui active et désactive les protéines, est un trait crucial de la plupart des voies de signalisation. Lors du développement, la majorité des signalisations consiste à activer ou réprimer des gènes en activant ou inhibant la transcription. Le cytosquelette est une autre cible majeure des signaux extracellulaires dans le développement, les réarrangements du réseau interne des protéines fibreuses permettant aux cellules de changer de forme, de se déplacer ou de se diviser. Les voies de signalisation sont également utilisées pour modifier passagèrement les activités enzymatique et métabolique de la cellule et exciter les neurones. Les signaux variés qu'une cellule peut recevoir à tout moment sont intégrés dans un dialogue entre les différentes voies de signalisation intracellulaire pour générer une réponse adaptée. L'encart 1F illustre les événements pouvant se produire lorsqu'une voie de signalisation importante du développement est déficiente. En général, les régions organisatrices fonctionnent en produisant des molécules de signalisation extracellulaire ou des facteurs qui influencent les voies de signalisation intracellulaire dans les cellules voisines afin de déterminer leur destinée. Ces régions productrices de signaux distincts sont aussi nommées centres de signalisation.

Que la cellule cible soit apte à répondre ou pas au signal d'induction, est un trait capital de l'induction. La capacité à répondre, ou **compétence**, peut dépendre, par exemple, de la présence du récepteur, des mécanismes de transduction adéquats, ou de certains facteurs de transcription requis pour activer les gènes. La compétence cellulaire pour une réponse donnée peut changer avec le temps ; par exemple, l'organisateur de Spemann peut induire des changements dans les cellules ciblées uniquement pendant une fenêtre de temps limitée.

Chez les embryons, ce qui est petit semble de mise pour la signalisation et la mise en place des structures corporelles. La plupart des patrons sont en effet spécifiés sur une échelle de seulement quelques dizaines de cellules et des distances de 100 à 500 µm. L'organisme au final peut être très grand, mais ceci est presque entièrement dû à la croissance une fois le patron de base formé.



Fig. 1.25 Un signal inducteur peut être transmis d'une cellule à une autre de trois façons. Le signal peut être une molécule sécrétée diffusible, en général une protéine, qui interagit avec un récepteur à la surface de la cellule cible (deuxième schéma), ou le signal peut être produit par un contact direct entre deux protéines complémentaires à la surface des cellules (troisième schéma). Si le signal implique une petite molécule, celle-ci peut passer directement d'une cellule à l'autre par une jonction communicante au niveau des deux membranes plasmiques mettant en communication les deux cytosols (quatrième schéma).



ENCART 1E Transduction du signal et voies de signalisation intracellulaires

Des protéines de signalisation extracellulaires agissent sur une cellule cible *via* des récepteurs situés sur sa membrane plasmique. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires spécifiques de protéines de signalisation variées. Cela signifie que les récepteurs exprimés par une cellule déterminent les signaux auxquels elle peut répondre. La protéine de signalisation elle-même ne pénètre pas dans la cellule, mais en se liant à la partie extracellulaire du récepteur à la surface cellulaire, elle active une cascade de molécules de signalisation intracellulaire, ce qui se traduit par la réponse cellulaire.

Pour de nombreux signaux de développement, la voie se termine par la modification du profil d'expression génique dans la cellule cible. La liaison de la molécule sur le récepteur à la surface de la cellule fournit une information qui doit être transmise du récepteur vers noyau à travers le cytoplasme. Ceci est réalisé par une voie de signalisation intracellulaire, composée d'une série

1.14 La réponse aux signaux inducteurs dépend de l'état de la cellule

Un signal inducteur peut être considéré comme une instruction aux cellules sur la façon de se comporter, mais les réponses à un tel signal dépendent entièrement de l'état des cellules, lié à l'histoire de leur développement. Non seulement la cellule individuelle doit être compétente pour répondre, mais le nombre de réponses possibles est en général très limité. Un signal inducteur ne peut choisir qu'une réponse à partir d'un petit nombre de réponses cellulaires possibles. Ainsi les signaux inducteurs instructifs devraient plutôt être nommés signaux sélectifs. Un vrai signal instructif serait celui qui fournit à la cellule de toutes nouvelles informations et capacités, avec l'apport de nouveaux gènes, par exemple, ce qui ne semble pas arriver au cours du développement.

Qu'à un moment donné un signal inducteur choisisse une réponse parmi plusieurs possibles, a plusieurs conséquences importantes pour l'économie biologique. D'une part, cela signifie que des signaux différents peuvent activer un gène donné à divers stades du développement : durant ce dernier, un même gène est souvent activé et inactivé à plusieurs reprises. D'autre part, le même signal peut être utilisé pour induire des réponses différentes dans des cellules distinctes. Une molécule de signalisation donnée peut, par exemple, agir sur plusieurs types de cellules, induisant chez chacune une réponse caractéristique et différente en fonction de son état du moment. de protéines interagissant ; des récepteurs différents utilisent des voies de signalisation différentes. De la même manière que des espèces animales variées utilisent les mêmes familles de molécules de signalisation, elles ont les mêmes caractéristiques générales pour des voies de signalisation correspondantes.

Les types généraux des voies de signalisation intracellulaire sont variés (Figure 1). En l'absence de signal, le récepteur est inoccupé et la plupart des protéines intracellulaires impliquées dans la signalisation se trouvent dans un état inactif. Lorsque le signal se lie à son récepteur, il déclenche une série d'événements biochimiques qui, dans le cas illustré, est une cascade de phosphorylations intracellulaires. L'information que la protéine de signalisation a fournie à son récepteur est transmise à travers le cytoplasme par un relais de protéines qui comprend une série de phosphorylations des protéines (comparer les deux schémas de gauche, figure 1). La phosphorylation des protéines, qui modifie leur activité et leurs interactions avec d'autres protéines, est ubiquitaire dans les voies de signalisation intracellulaire comme moyen de transmission du signal en aval, et est réalisée par des enzymes nommées protéines kinases. Un grand groupe de récepteurs fonctionne de cette façon. La première étape de la voie implique la phosphorylation du domaine intracellulaire du récepteur par une protéine kinase, et la voie se termine par la phosphorylation et l'activation d'une protéine kinase qui pénètre dans le noyau pour phosphoryler et activer un facteur de transcription spécifique, contrôlant ainsi de manière sélective l'expression du gène. Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF pour Fibroblast Growth Factor, voir Encart 4E), une protéine de signalisation sécrétée utilisée dans de nombreux contextes variés durant tout le développement, le facteur de croissance épidermique (EGF pour Epidermal Growth Factor) et de nombreux autres signaux extracellulaires, utilisent des voies de ce tvpe.

D'autres signaux extracellulaires activent la voie intracellulaire en entraînant le déplacement d'un facteur de transcription ou autre protéine régulatrice de gène (telle un co-activateur ou un co-répresseur) du cytoplasme vers le noyau (schéma central droit, figure 1). Les protéines Wnt (Encart 4B), la famille des protéines Hedgehog (Encart 2F) et les protéines de la famille du facteur de croissance transformant- β (TGF- β pour Transforming Growth Factor- β) (Encart 4C), sont des protéines de signalisation extracellulaires utilisant ce type de voie et qui seront rencontrées tout au long de cet ouvrage.

Le récepteur Notch contrôle encore un autre type de voie de signalisation. Cette protéine transmembranaire est activée par un contact direct avec ses ligands (également des protéines transmembranaires) sur une autre cellule (ligand est le terme général pour une molécule qui se lie spécifiquement à une autre biomolécule). Dans ce cas, la liaison du ligand à Notch se traduit par le clivage du domaine intracellulaire du récepteur. Alors libre de se déplacer vers le noyau, celui-ci agit comme un co-activateur (schéma de droite, figure 1). La voie Notch (Encart 5D) est couramment utilisée dans la détermination du destin des cellules.

Lorsque la cellule ne reçoit aucun signal, il est primordial que les voies de signalisation intracellulaires restent inactives. En l'absence de signal par exemple, les facteurs de transcription et autres protéines régulatrices de gènes peuvent être liés à d'autres protéines en un complexe inactif dans le cytoplasme, ou être ciblés pour être dégradés. Les voies de signalisation peuvent également contenir des boucles de rétroaction modulant leur propre activité. En outre, les cellules peuvent recevoir plusieurs signaux en même temps et un dialogue peut se créer entre les voies de signalisation intracellulaires pour assurer la réponse cellulaire appropriée.

Certaines petites molécules agissant comme signaux extracellulaires au cours du développement tels que l'acide rétinoïque (Encart 5C), les hormones stéroïdes, et certaines hormones végétales comme l'éthylène, peuvent passer librement à travers la membrane cellulaire. Elles interagissent avec des récepteurs spécifiques présents dans le cytoplasme ou dans le noyau.

L'évolution peut paraître paresseuse par rapport à cet aspect du développement car un petit nombre de molécules de signalisation intercellulaires est utilisé à maintes reprises à des fins variées, c'est ce qui sera vu dans les chapitres à venir.

1.15 La mise en place du patron de formation peut impliquer l'interprétation d'informations de position

Un modèle simple non biologique, le drapeau français, peut illustrer un mode général de la mise en place du patron de formation (Fig. 1.26). Le drapeau français possède un patron simple : un tiers bleu, un tiers blanc et un tiers rouge, avec un axe unique. Disponible en plusieurs tailles, mais toujours selon le même patron, il peut être utilisé pour simuler la capacité d'un embryon à réguler. Soit une ligne de cellules qui peut varier en longueur, et dont chacune de ces cellules peut être bleue, blanche ou rouge, quel est le type de mécanisme requis pour que cette ligne se développe selon le patron du drapeau français ?

Une solution pour le groupe de cellules est d'utiliser l'information de position, c'est-à-dire l'information de leur position sur la ligne par rapport aux limites à chaque extrémité. Chaque cellule acquiert ainsi sa propre valeur de position. Après avoir acquis leur valeur de position, les cellules interprètent ces informations en se différenciant selon leur programme génétique. Celles du tiers à gauche de la ligne deviendront



Fig. 1.26 Le drapeau français.

ENCART 1F Quand le développement est défectueux

La voie de signalisation stimulée par la petite protéine sécrétée Sonic hedgehog (Shh) (nommée d'après la protéine Hedgehog de la drosophile, premier membre de cette famille, à avoir été découvert) régule très tôt dans l'embryogenèse de nombreux processus du développement humain et d'autres vertébrés. Chez l'adulte, Shh contrôle la croissance des cellules souches, et le dérèglement de cette voie de signalisation conduit à la formation de tumeurs. Comme de nombreuses autres voies de signalisation

dans le développement (Encart 1E), les résultats finaux de la signalisation Shh sont des changements dans l'expression des gènes.

Identifier les éléments des voies de signalisation intracellulaires peut aider à la compréhension de certaines anomalies du développement, et Shh en est un bon exemple (Figure 1). L'holoprosencéphalie est une malformation congénitale relativement commune caractérisée par un défaut du clivage médian du cerveau et des anomalies faciales. La gravité varie beaucoup depuis un état caractérisé par un défaut majeur de la division du cerveau antérieur (prosencéphale) qui sépare au niveau de la ligne médiane les hémisphères cérébraux droit et gauche, une absence totale de ligne médiane au niveau du visage et une mort fœtale, jusqu'à un état présentant un léger défaut de division du prosencéphale et pour seul défaut évident, une fente labiale ou la présence d'une incisive au lieu de deux.

Les premières indications de l'implication de Shh dans le développement du cerveau sont apparues au début des années 1990, quand l'expression de Shh a été décrite sur la ligne médiane ventrale du système nerveux chez la souris. En 1996, des généticiens cliniciens ont identifié Shh comme l'un des gènes affectés chez les patients avec une holoprosen-

céphalie congénitale. À la même époque, l'invalidation totale de *Shh* expérimentalement chez la souris (Section 3.10 et Encart 3D pour la technique du *knock-out*) a été associée à l'absence de division du prosencéphale, une cyclopie embryonnaire, avec perte des structures faciales médianes et développement d'un seul œil au milieu de la face, une condition représentant la manifestation la plus sévère de l'holoprosencéphalie.

Les généticiens cliniciens continuèrent à identifier les gènes impliqués dans holoprosencéphalie et plusieurs gènes codant des composants de la voie Shh furent décrits. Dans tous les cas, la cause de l'anomalie pouvait être attribuée à un défaut de signalisation Shh, mais des gènes distincts étaient affectés dans les différents cas. Chez certains patients, l'anomalie était causée par des mutations dans le gène *Shh* lui-même, mais chez d'autres les gènes affectés codaient soit le récepteur de Shh (Patched), soit l'un des facteurs de transcription (GLI2) qui se déplace dans le noyau pour réguler l'expression génique. Chez certains patients, des mutations ont été trouvées sur le gène codant une enzyme nécessaire à la synthèse du cholestérol. Le cholestérol favorise l'acti-



vité d'une protéine transmembranaire nommée Smoothened, qui agit conjointement avec Patched pour contrôler la voie Shh. La Figure 1 montre une version simplifiée de la voie de signalisation Shh et comment des mutations concernant divers composants de la voie (marquées par des astérisques) permettent de bloquer la voie, ce qui entraîne une réduction ou une perte de signalisation Shh (la voie complète Shh est illustrée dans l'Encart 11D). La région de la face affectée par la réduction de signalisation Shh est indiquée. La signalisation Shh chez les vertébrés intervient sur les structures cellulaires appelées cils primaires, qui sont des cils non motiles présents sur la plupart des types cellulaires des vertébrés. Certains patients avec des maladies génétiques dans lesquelles la formation de ces structures est défectueuse ont des traits faciaux distinctifs. Ainsi, la découverte de gènes produisant des symptômes similaires chez des patients humains peut mettre en évidence des gènes dans une voie de développement commune.

Des facteurs environnementaux peuvent aussi causer des défauts faciaux semblables à ceux produits par des mutations sur les gènes des protéines de la voie Shh. Des brebis gravides nourries sur des pâturages où pousse le vératre Veratrum cali-

fornicum, peuvent donner naissance à des agneaux avec des anomalies faciales sévères telles que la cyclopie. L'agent chimique de la plante provoquant ces défauts est la cyclopamine, un alcaloïde qui perturbe aussi la signalisation Shh. Des agents chimiques et autres facteurs environnementaux perturbant le développement normal sont appelés tératogènes (Encart 11A). La cyclopamine interfère avec l'activité de Smoothened et réduit la signalisation de Shh (Figure 1). Cette propriété de la cyclopamine est maintenant à l'étude dans un contexte thérapeutique pour développer des médicaments afin de traiter les cancers présentant une signalisation Shh anormale. bleues, celles du tiers médian blanches, et ainsi de suite. Une très bonne preuve que les cellules utilisent des informations de position est fournie par la régénération des membres d'amphibiens et d'insectes, dans lesquels les régions manquantes sont précisément remplacées (voir Chapitre 13).

L'élaboration du patron basée sur des valeurs de position implique au moins deux étapes distinctes : d'abord la valeur de position doit être associée à une certaine limite, et ensuite elle doit être interprétée par la cellule. La séparation de ces deux processus a une conséquence importante : aucune relation fixe entre les valeurs de position et la façon dont elles sont interprétées n'est requise. Dans des circonstances différentes, les mêmes informations de position et ensembles de valeurs de position pourraient être utilisés pour générer le drapeau italien ou un autre patron. La manière dont les valeurs de position seront interprétées, dépend des instructions génétiques particulières actives dans le temps au sein du groupe de cellules, et donc de l'histoire du développement de ces cellules.

Les cellules peuvent avoir leurs valeurs de position fixées par divers mécanismes. Le plus simple est basé sur le gradient d'une substance. Si la concentration de certains agents chimiques diminue entre les deux extrémités d'une ligne de cellules, alors la concentration pour toute cellule le long de la ligne fournit une information de position qui indique à la cellule sa position effective par rapport aux extrémités (Fig. 1.27). Un agent chimique dont la concentration varie et qui est impliqué dans la formation d'un patron est nommé un morphogène. Dans le cas du drapeau français, une source de morphogène est envisagée à une extrémité et un écoulement à l'autre, les concentrations de morphogène aux deux extrémités étant maintenues constantes, mais différentes l'une de l'autre. Comme le morphogène diffuse sur toute la ligne, sa concentration en tout point fournit en réalité des informations de position. Si les cellules peuvent répondre pour des concentrations seuil du morphogène, par exemple au-dessus d'une concentration donnée les cellules se développent en bleu, tandis qu'au-dessous elles deviennent blanches, et à une concentration encore inférieure elles deviennent rouges, la lignée de cellules se développera selon le drapeau français (Fig. 1.27). Les seuils peuvent représenter soit la quantité de morphogène qui doit se lier aux récepteurs pour activer un système de signalisation intracellulaire, soit des concentrations de facteurs de transcription requis pour l'activation de gènes particuliers. L'utilisation des seuils de concentration de facteurs de transcription pour indiquer la position est très bien illustrée dans le développement précoce de la drosophile, et sera vue Chapitre 2. Les interactions intercellulaires directes et les mécanismes de synchronisation sont d'autres façons de fournir des informations de position et de spécifier les valeurs de position.

Le modèle du drapeau français illustre deux caractéristiques importantes du développement en situation réelle. La première est que même si la longueur de la ligne varie, le système se régule et le patron se formera toujours correctement, étant donné que les limites du système sont bien définies en gardant constantes les différentes concentrations de morphogène à chaque extrémité. La seconde est que le système pourrait également régénérer le patron original complet s'il était coupé en deux, à condition que les concentrations limites soient ré-établies. En ce sens il est bien régulateur. Discuté ici pour l'élaboration d'un patron à une dimension, ce modèle peut facilement être étendu pour fournir un patron à deux dimensions (Fig. 1.28).

La détermination de l'information de position est encore peu claire : la diffusion du morphogène est l'un des mécanismes proposés, mais cela n'est pas assez sûr. La finesse de précision des différences de position est encore inconnue. Par exemple, chaque cellule de l'embryon précoce possède-t-elle une valeur de position particulière qui lui est propre, et est-elle en mesure d'utiliser cette différence ?

Une autre façon de générer un patron dans un groupe de cellules serait de « trier » des cellules différenciées selon un mode poivre et sel de sorte qu'elles occupent une position distincte (Fig. 1.29). Les cellules du groupe pourraient d'abord se différencier selon un arrangement spatial aléatoire en raison des différences de sensibilité à un signal global ou en réponse à des différences temporelles. Le tri a été décrit dans divers systèmes expérimentaux dans lesquels deux ou plusieurs tissus sont dissociés en cellules individuelles, puis les cellules se mélangent et se ré-agrègent. Dans nombre de ces ré-agrégats mixtes, les cellules semblables ont tendance à s'associer. Cela peut aboutir à la formation d'agrégats séparés, ou pour des cellules d'un type donné à adopter une position particulière au sein d'un agrégat mixte. La base du tri repose sur la possession de molécules d'adhérence cellulaire distinctes à la surface des cellules



Fig. 1.27 Le drapeau français comme modèle d'élaboration d'un patron. Chaque cellule d'une rangée de cellules a le potentiel pour devenir bleue, blanche ou rouge. La rangée de cellules est exposée au gradient de concentration d'une certaine substance, chaque cellule acquérant ainsi une valeur de position définie par la concentration à son site. Chaque cellule interprète alors la valeur de position acquise et se différencie en bleu, blanc ou rouge selon un programme génétique prédéterminé, formant ainsi le patron du drapeau français. Les substances pouvant diriger ainsi le devenir des cellules sont nommées morphogènes. La condition fondamentale d'un tel système est que les concentrations de la substance à chacune des extrémités du gradient demeurent différentes l'une de l'autre mais constantes, fixant ainsi les limites du système. Chaque cellule doit aussi posséder l'information requise pour interpréter sa valeur de position en une réponse pour le développement. L'interprétation de la valeur de position est basée sur des seuils avec des réponses distinctes pour les différentes concentrations de morphogènes.



Fig. 1.28 L'information de position peut **être utilisée pour élaborer les patrons.** Un bon exemple est illustré ici où les gens assis dans un stade ont chacun une valeur de position définie par leur rang et le numéro de leur place. À chaque position correspond une couleur de drapeau à lever, et c'est ce qui crée le patron. Un patron différent pourrait être obtenu avec des instructions différentes pour les couleurs, les informations de position peuvent ainsi produire toute une variété de patrons.

Fig. 1.29 Deux façons pour qu'un groupe de cellules produise un patron. Le cadre supérieur illustre comment une information de position peut conduire à la formation d'une bande rouge. Le cadre inférieur montre comment le même résultat est obtenu par certaines cellules du groupe qui se différencient au hasard puis s'associent préférentiellement avec leurs semblables. ou sur des quantités différentes de ces mêmes molécules d'adhérence cellulaire. Bien que l'information de position soit le mode général de formation du patron dans les embryons, quelques cas seront discutés où cette stratégie alternative est utilisée, par exemple dans la genèse du mésoderme et de l'endoderme dans les embryons de poisson-zèbre et du tissu extra-embryonnaire et embryonnaire dans les embryons précoces de souris. Le tri a aussi été invoqué comme mécanisme pour créer des limites nettes entre différents types cellulaires.

1.16 L'inhibition latérale peut générer des patrons spatiaux

Nombre de structures, telles les plumes sur la peau d'un oiseau, sont plus ou moins régulièrement espacées les unes des autres. Un mécanisme produisant un tel espacement est l'**inhibition latérale** (Fig. 1.30). Dans un ensemble de cellules ayant par exemple toutes le potentiel de différencier des plumes, il est possible d'espacer régulièrement celles qui formeront des plumes par un mécanisme dans lequel les premières cellules qui commencent à former des plumes (ce qui se produit avant tout au hasard) empêchent les cellules adjacentes de le faire. Cela rappelle l'espacement régulier des arbres dans une forêt dû à la compétition pour la lumière du soleil et les nutriments. Chez les embryons, l'inhibition latérale est souvent le résultat de la cellule différenciée produisant une molécule inhibitrice qui agit localement sur ses voisines les plus proches pour les empêcher de se développer de la même manière.

1.17 La localisation de déterminants cytoplasmiques et la division cellulaire asymétrique peuvent conduire à des cellules filles distinctes

La spécification de position est juste une facon de fournir aux cellules une identité donnée. Un mécanisme distinct est basé sur la localisation cytoplasmique de facteurs et la **division cellulaire asymétrique** (Fig. 1.31). Une division asymétrique est ainsi nommée parce qu'elle donne deux cellules filles aux propriétés différentes, en dehors de toute influence de l'environnement. Les propriétés de ces cellules dépendent donc de leur lignage et non de signaux environnementaux. Certaines divisions cellulaires asymétriques, en produisant des cellules de tailles différentes, sont aussi des divisions inégales, mais ce n'est généralement pas la caractéristique la plus importante chez les animaux. C'est la répartition inégale de facteurs cytoplasmiques qui rend la division asymétrique. Une autre façon de créer le patron du drapeau français à partir du zygote serait d'avoir des différences chimiques (correspondant au bleu, blanc et rouge) réparties dans le zygote sous forme de déterminants préfigurant le drapeau français. Lorsque le zygote subit le clivage, ces déterminants cytoplasmiques se répartiraient entre les cellules d'une manière inégale et un drapeau français se développerait. Cela ne nécessiterait aucune interaction entre les cellules, qui auraient leur destin déterminé dès le début.

Bien que ces exemples extrêmes de développement mosaïque (voir Section 1.12) soient absents dans la nature, il y a des cas bien connus où les zygotes ou les cellules se divisent avec une répartition inégale de certains déterminants cytoplasmiques entre les deux cellules filles qui se développent alors différemment. Ceci se



produit, par exemple, lors de la première division du zygote du nématode, et qui définit l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Les cellules germinales de la drosophile sont également spécifiées par des déterminants cytoplasmiques, contenus dans ce cas dans le cytoplasme situé à l'extrémité postérieure du zygote. Chez le xénope, la protéine VegT localisée dans la région végétative du zygote est un déterminant cytoplasmique clé dans les premiers stades du développement embryonnaire. En général cependant, avec l'avancée du développement, les cellules filles deviennent différentes les unes des autres en raison de signaux provenant d'autres cellules ou du milieu extracellulaire, plutôt qu'en raison de la répartition inégale des déterminants cytoplasmiques.

Un type très particulier de division asymétrique est observé dans les cellules souches. Quand elles se divisent, ces cellules à auto-renouvellement peuvent produire une nouvelle cellule souche et une autre cellule fille qui va se différencier en un ou plusieurs types cellulaires (Fig. 1.32). Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) présentes dans les embryons très précoces sont capables de donner naissance à tous les types cellulaires du corps, alors que chez les adultes, des cellules souches à potentiel apparemment plus limité sont responsables du renouvellement continu de tissus tels que le sang, l'épiderme de la peau et l'épithélium intestinal, ainsi que du remplacement de tissus tels que les muscles lorsque cela est nécessaire. La différence dans le comportement des cellules filles produites par division d'une cellule souche peut être due soit à une distribution asymétrique des déterminants cytoplasmiques soit aux effets des signaux externes. La genèse des neurones chez la drosophile, par exemple, dépend de la répartition asymétrique des facteurs cytoplasmiques dans les cellules souches neurales, alors que la production des différents types de cellules du sang semble être régulée dans une large mesure par des signaux extracellulaires.

Les cellules souches embryonnaires, pouvant générer tous les types cellulaires du corps, sont **pluripotentes**, alors que les cellules souches qui donnent lieu à un nombre limité de types cellulaires sont **multipotentes**. Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, qui donnent naissance aux différents types de cellules sanguines, sont un exemple de cellules souches multipotentes. Les cellules souches, examinées Chapitre 8, sont d'un grand intérêt pour la médecine régénérative, car elles pourraient fournir un moyen de réparer ou de remplacer des organes endommagés. Pour la plupart des animaux, la seule cellule qui peut donner lieu à un nouvel organisme complet est le zygote, qui est **totipotent**.

1.18 L'embryon contient un programme générateur plutôt que descriptif

Le zygote contient toute l'information pour le développement embryonnaire. Comment celle-ci est-elle alors interprétée pour donner naissance à un embryon ? Une possibilité serait qu'un programme descriptif dans le génome code en quelque sorte la structure de l'organisme. L'ADN contient-il une description complète de l'organisme auquel il donnera lieu, est-il un plan pour l'organisme ? La réponse est non. En revanche, le génome contient un programme d'instructions pour la fabrication de l'organisme, un programme générateur qui détermine où et quand différentes protéines sont à synthétiser et commande ainsi le comportement des cellules.

Un programme descriptif, comme un plan, décrit un objet en détail, alors qu'un programme générateur décrit comment faire un objet. Pour le même objet les programmes sont très différents. Considérons l'origami, l'art du pliage de papier. En pliant une feuille de papier dans diverses directions, il est assez facile de faire un chapeau de papier ou un oiseau à partir d'une seule feuille. Décrire en détail la forme finale du document avec les relations complexes entre ses parties est vraiment très difficile, et n'est pas d'un grand secours pour expliquer comment y parvenir. Beaucoup plus utiles et plus faciles à formuler sont les instructions sur la façon de plier le papier. La raison en est que des instructions simples sur le pliage ont des conséquences spatiales complexes. Dans le développement, l'action des gènes définit de manière similaire la séquence d'événements qui peuvent apporter des changements profonds dans l'embryon. On peut donc penser à l'information génétique dans le zygote comme équivalent aux instructions de pliage en origami, les deux contiennent un programme générateur de fabrication d'une structure particulière.



Fig. 1.30 L'inhibition latérale peut conduire à un patron spatial. L'inhibition latérale se produit quand des structures en développement produisent un inhibiteur qui empêche la formation de structures similaires dans leur voisinage, ce qui conduit à l'espacement régulier des structures.



Fig. 1.31 Division cellulaire avec distribution asymétrique de déterminants cytoplasmiques. Si une molécule donnée n'est pas distribuée de façon homogène dans le cytoplasme d'une cellule mère, la division cellulaire la répartira de façon inégale entre les deux cellules filles. Plus le déterminant cytoplasmique est localisé en un endroit précis dans la cellule mère, plus il y a de chance qu'il soit affecté à une seule des cellules filles, l'autre ne recevant rien, ce qui conduit à distinguer les deux cellules filles.

1.19 L'infaillibilité du développement est atteinte de plusieurs façons

Le développement est étonnamment cohérent et sûr ; il suffit de regarder la longueur similaire des deux jambes, chacune se développant tout à fait indépendamment de l'autre sur environ quinze ans (Chapitre 13). Le développement embryonnaire doit donc être fiable pour un fonctionnement correct de l'organisme. Par exemple, pour être capable de voler normalement, la taille et la forme des deux ailes d'un oiseau doivent être très similaires. Comment cette fiabilité est atteinte est une question importante du développement.

Le développement doit être infaillible malgré les fluctuations se produisant dans l'embryon ou son environnement externe. Les fluctuations internes incluent de faibles variations des concentrations moléculaires, et aussi des altérations résultant, par exemple, de mutations sur des gènes non directement liés au développement de l'organe en question. Les facteurs externes pouvant perturber le développement incluent la température et les agents chimiques environnementaux. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent les processus de développement résistent à ces grands changements et par conséquent sont dits fiables.

L'une des questions centrales de l'infaillibilité porte sur l'élaboration du patron. Comment des cellules sont-elles instruites de façon fiable pour se comporter d'une manière donnée à une position donnée ? La redondance apparente des mécanismes et la rétroaction négative sont deux moyens d'assurer l'infaillibilité au cours du développement. La redondance signifie l'existence de deux ou plusieurs façons de mener à bien un processus donné. Si l'un échoue pour une raison quelconque, un autre va prendre le relais. C'est comme avoir deux batteries dans une voiture au lieu d'une seule. La vraie redondance, comme avoir dans un génome haploïde deux gènes identiques avec des fonctions identiques est rare, exception faite de cas comme l'ARNr où il y a souvent des centaines de copies de gènes similaires. La redondance apparente, par contre, où un processus donné peut être spécifié par plusieurs mécanismes distincts, est vraisemblablement un des moyens permettant aux embryons d'arriver à de tels résultats précis et fiables. Ce type de situation n'est pas une véritable redondance, mais peut en donner l'impression si après le retrait d'un mécanisme le résultat apparent reste normal. Les façons multiples de réaliser un processus, rendent ce dernier plus fiable et résistant à des perturbations environnementales ou génétiques.

La rétroaction négative permet aussi d'assurer la cohérence. Dans ce cas, le produit final d'un processus inhibe un stade en amont et maintient ainsi constant le niveau du produit (Fig. 1.21). Le métabolisme en est un exemple classique, où le produit final d'une voie biochimique inhibe l'enzyme qui intervient au début de la voie. Un autre mécanisme de fiabilité a trait à la complexité des réseaux d'activité des gènes à l'œuvre dans le développement. Il existe des preuves pour que ces réseaux, qui impliquent des voies multiples, soient fiables et plutôt insensibles à de petites variations, par exemple dans les taux des processus individuels impliqués.

1.20 La complexité du développement embryonnaire est due à la complexité même des cellules

Les cellules sont, dans un sens, plus complexes que l'embryon lui-même. Autrement dit, dans une cellule donnée le réseau d'interactions entre les protéines et l'ADN contient beaucoup plus d'éléments et est beaucoup plus complexe que les interactions entre les cellules de l'embryon en développement. Les cellules sont presque toujours plus ingénieuses qu'on ne peut l'imaginer. Chaque activité cellulaire de base impliquée dans le développement, telle que la division, la réponse à des signaux cellulaires, et la motilité, est le résultat d'interactions au sein d'une population de nombreuses protéines intracellulaires variées dont la composition varie au fil du temps et dans les différents endroits de la cellule. La division cellulaire, par exemple, est un programme de biologie cellulaire complexe qui se déroule sur une période de temps selon un ordre fixe d'étapes, et nécessite la construction et l'organisation précise de structures intracellulaires spécialisées lors de la mitose.

Chaque cellule exprime à tout moment des milliers de gènes variés, dont une grande partie de ces expressions géniques peut résulter d'un programme d'activité intrinsèque, en dehors de signaux externes. C'est cette complexité qui régit comment les cellules répondent aux signaux qu'elles reçoivent et l'état interne d'une cellule définit comment elle réagit à un signal donné. Cet état reflète l'histoire du développement de la cellule, les cellules ayant une bonne mémoire, et des cellules très différentes peuvent répondre au même signal de façons très diverses. De nombreux exemples décriront des réponses biologiques variées fournies par des signaux identiques, utilisés maintes et maintes fois par des cellules différentes à divers stades du développement embryonnaire.

La compréhension des interactions des gènes et des protéines dans une cellule, sans parler du développement de l'embryon, n'est actuellement que partielle. Cependant, des technologies nouvelles permettent désormais de détecter l'activité simultanée de centaines de gènes dans un tissu donné. La biologie des systèmes est une discipline qui déploie aussi des moyens pour reconstruire les réseaux de signalisation très complexes utilisés par les cellules. Comment interpréter cette information et donner un sens biologique aux profils d'activité génique identifiés, est une tâche immense pour l'avenir.

1.21 Le développement est un élément clé de l'évolution

La similitude des mécanismes et des gènes du développement chez des animaux aussi différents que les mouches et les vertébrés, est le résultat de l'évolution. Tous les animaux ayant évolué à partir d'un ancêtre multicellulaire unique, il est inévitable que de nombreuses espèces distinctes détiennent en commun certains mécanismes de développement, et qu'au cours de l'évolution de nouveaux mécanismes soient apparus chez des groupes d'animaux différents. L'évolution du développement est abordée plus en détail Chapitre 14.

Selon la théorie fondamentale de l'évolution par la sélection naturelle de Darwin, des modifications affectant les gènes altèrent la façon dont un organisme se développe, et ces changements déterminent en retour les rapports que l'adulte aura avec son environnement. Si un changement de développement conduit à ce que des adultes soient mieux adaptés pour survivre et se reproduire dans un environnement donné, la variation génétique responsable sera choisie et retenue dans la population. Ainsi des changements affectant le développement, dus à des variations géniques, sont essentiels pour l'évolution.

Le membre des vertébrés constitue un exemple clair de l'entremise de l'évolution dans le développement. Dans le Chapitre 14 sera examiné comment l'analyse des preuves fossiles a montré que les membres des vertébrés terrestres ont évolué à partir de nageoires et comment cette évolution a pu être reconstituée à partir de la génétique et la biologie du développement (voir Section 14.7). Sera également abordé comment le modèle de base du membre à cinq doigts a pu évoluer pour donner des membres aussi différents que ceux de la chauve-souris, du cheval et de l'Homme. Chez la chauve-souris, les doigts du membre antérieur sont extrêmement longs et supportent une membrane alaire, alors que chez le cheval, un doigt de la « main » du membre antérieur ou du « pied » du membre postérieur est devenu un os long qui forme la partie inférieure de la jambe et le sabot, tandis que certains autres doigts ont été perdus (Fig. 14.25). Les archives fossiles donnent de nombreux autres exemples de changements évolutifs. Les oiseaux, avec seulement trois doigts dans les ailes, ont évolué à partir d'ancêtres dinosaures chez lesquels s'est produite une réduction de leurs doigts (Encart 14B).

Alors que certaines étapes majeures dans l'évolution peuvent être décrites, les gènes impliqués ne sont pas faciles à identifier. Parmi les quelques exemples de mutations qui ont été identifiées comme associées à des changements évolutifs, il est apparu que celles-ci ne portaient pas sur les séquences codant les protéines elles-mêmes, mais dans leurs régions de contrôle (Chapitre 14). Ainsi, l'accent est de plus en plus mis sur l'importance des séquences régulatrices comme outils de l'évolution. Se posent également les questions de savoir quelle était l'importance des étapes génétiques qui ont permis l'émergence de formes nouvelles, et comment les nouvelles structures évoluent. Mais il ne fait aucun doute que tout ceci résulte de changements affectant le développement embryonnaire.



Fig. 1.32 Cellules souches. Les cellules souches (S) sont des cellules qui peuvent à la fois s'auto-renouveler et donner des types cellulaires différenciés. Une cellule fille issue de la division d'une cellule souche peut soit donner une autre cellule souche, soit donner un type cellulaire différent (X).

RÉSUMÉ

Le développement résulte du comportement coordonné des cellules. Les processus majeurs impliqués dans le développement sont l'élaboration d'un patron, la morphogenèse ou genèse de la forme, la différenciation cellulaire, la croissance, la migration et la mort cellulaires, impliquant des activités cellulaires telles que la signalisation intercellulaire et l'activation ou la répression de gènes. Les gènes contrôlent le comportement des cellules en fixant le lieu et le moment de la synthèse des protéines, la biologie cellulaire fournissant alors le lien entre l'action des gènes et les modalités du développement. Au cours du développement, les cellules changent leur expression génique, leur forme, leur production de signaux ou leur réponse à ceux-ci, leur taux de prolifération et leur comportement migratoire. Tous ces aspects du comportement cellulaire sont contrôlés avant tout par la présence de protéines spécifiques, l'activité génique contrôlant les protéines à produire. Etant donné que les cellules somatiques de l'embryon contiennent en général toutes la même information génétique, les variations qui se produisent dans le développement sont contrôlées par l'activité différentielle de gènes sélectionnés dans des groupes différents de cellules. Les régions de contrôle sur les gènes sont essentielles dans ce processus. Le développement est progressif et la destinée des cellules se détermine à des moments différents. Le potentiel de développement des cellules dans l'embryon précoce est en général bien plus grand que leur destin normal, mais ce potentiel se restreint au cours du développement. Des interactions inductrices, basées sur des signaux émis entre tissus ou cellules, sont l'un des principaux moyens de changer la destinée des cellules et de diriger le développement. Les divisions cellulaires asymétriques, par lesquelles des éléments cytoplasmiques sont inégalement distribués aux cellules filles, peuvent aussi générer des cellules différentes. Un moyen fréquent de mise en place d'un patron se fait par l'information de position, les cellules acquérant d'abord une valeur de position par rapport à des limites, puis interprétant leurs valeurs de position en se comportant différemment. Une autre stratégie pour générer un patron implique des cellules devenant différentes et subissant ensuite un tri. Les signaux de développement sont plus sélectifs qu'instructifs, choisissant une voie de développement, ou une autre, offerte à la cellule à un moment donné. L'embryon contient un programme générateur et non descriptif, comparable à des instructions permettant d'élaborer une structure plutôt que son plan. Divers mécanismes, y compris la redondance apparente et la rétroaction négative, sont utilisés pour rendre le développement remarquablement sûr et fiable. La complexité du développement réside à l'intérieur des cellules. L'évolution est intimement liée au développement parce que les changements héréditaires dans l'organisme adulte doivent inévitablement être le résultat de changements dans le programme génétique du développement embryonnaire.

Résumé du Chapitre 1

- Toute l'information pour le développement est contenue dans l'œuf fécondé, le zygote diploïde. Le génome du zygote contient le programme des instructions pour générer un organisme. Les constituants cytoplasmiques du zygote, et des cellules qui en sont issues, sont les acteurs essentiels pour assurer, avec les gènes, le programme du développement.
- L'activité génique hautement régulée, en contrôlant quelles sont les protéines à synthétiser, où et quand, dirige une séquence d'activités cellulaires qui induisent les profonds changements cellulaires apparaissant dans l'embryon au cours du développement.
- Les processus majeurs du développement sont l'élaboration du patron de l'organisation corporelle, la morphogenèse, la différenciation cellulaire et la croissance, qui sont contrôlées par la communication entre les cellules de l'embryon et des changements de l'expression génique.
- Le développement est progressif, la destinée des cellules se spécifiant de façon de plus en plus précise au fil du processus.
- Chez l'embryon précoce les cellules ont en général un plus grand potentiel de développement que celui correspondant à leur destinée normale, ce qui permet un développement normal des embryons même après le prélèvement, l'ajout, ou la greffe de cellules dans différents sites (en particulier chez les embryons de vertébrés).
- Le potentiel de développement des cellules se restreint avec la progression du développement.
- De nombreux gènes interviennent pour contrôler les interactions complexes se produisant au cours du développement, et l'infaillibilité de celui-ci est obtenue de plusieurs façons.

- Les changements dans le développement embryonnaire sont à la base de l'évolution des organismes pluricellulaires.
- Une parfaite compréhension du développement est loin d'être atteinte. Si les principes de base et certains systèmes de développement sont bien compris, il reste encore de nombreux points laissés en suspens.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Le but ultime de la biologie du développement est la compréhension du développement humain. Avec vos propres mots discuter trois domaines de la médecine concernés par l'étude de la biologie du développement.

2. Le philosophe grec Aristote envisageait deux théories pour le développement, la préformation et l'épigenèse. Décrire le sens de ces deux idées, se référer au concept de l'homoncule en décrivant la préformation, et à l'art de l'origami en décrivant l'épigenèse. Qu'est ce qui décrit le mieux la perception actuelle du développement ?

3. Le concept des « déterminants » de Weismann a été confirmé par les expériences de Roux démontrant le développement mosaïque de la grenouille. Comment les déterminants conduisent-ils à un développement mosaïque ? Pourquoi le concept de développement à régulation de Driesch convient-il mieux pour expliquer la gémellité humaine ?

4. L'élaboration du patron est un processus clé dans l'étude du développement. Décrire trois exemples, l'illustrant et expliquer quels sont les patrons générés.

5. Définir brièvement les comportements cellulaires suivants : signalisation intercellulaire, prolifération cellulaire, différenciation cellulaire, mouvement cellulaire, changement de forme cellulaire, expression génique, mort cellulaire.

6. Comparer le rôle des gènes et des protéines de ménage au cours du développement avec celui des gènes et des protéines spécifiques des tissus. Quelle est la classe de gènes et de protéines la plus importante au cours du développement, celle de ménage ou celle spécifique de tissus ? Donner des exemples.

7. Toutes les cellules d'un organisme contiennent des gènes identiques, toutefois l'organisme contient des types cellulaires différents. Comment le concept d'« expression génique différentielle » résout-il ce paradoxe de l'« équivalence génétique » ?

8. Comment fonctionnent les facteurs de transcription ? Quelle est leur relation avec les régions contrôle de l'ADN ?

9. Comparer la destinée cellulaire et la détermination cellulaire. Quels types d'expérience permettent de distinguer la destinée de la détermination ?

10. Quelles sont les trois voies au cours desquelles des signaux inducteurs peuvent être transmis à l'embryon en cours de développement ? Dans quelles circonstances un signal inducteur est-il un morphogène ?

11. Quelle est la relation entre information de position et élaboration d'un patron ? Donner un exemple.

QCM

NB Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.

1. Parmi les espèces suivantes laquelle constitue un « organisme modèle » de vertébré pour l'étude du développement ?

- a) Caenorhabditis elegans
- b) Drosophila melanogaster

- c) Homo sapiens
- d) Xenopus laevis

2. Parmi les propositions suivantes laquelle indique les cellules germinales ?

- a) cellules des gonades
- b) cellules intestinales
- c) spermatozoïdes et ovules
- d) zygotes

3. Quelle proposition décrit le mieux les relations entre génotype et phénotype ?

- a) « Génotype » et « phénotype » décrivent tous les deux les propriétés physiques des cellules et de l'organisme, en utilisant juste des mots et symboles différents
- b) Le phénotype est la conséquence absolue du génotype d'une cellule, c'est pourquoi est reconnu maintenant le principe du « déterminisme génétique ».
- c) Les gènes présents dans une cellule constituent le génotype de cette cellule, et les gènes contrôlent directement le phénotype de la cellule.
- d) Le génotype détermine quelles sont les protéines contenues dans une cellule, et les protéines déterminent à leur tour les propriétés de la cellule, ou phénotype.

4. Quelle proposition se rapporterait à un allèle dominant d'un gène ?

- a) un allèle qui confère un phénotype à un organisme à l'état hétérozygote, c'est-à-dire présent en seulement une copie
- b) un allèle qui confère un phénotype seulement quand les deux copies du gène sont mutées, c'est-à-dire quand il est à l'état homozygote
- c) un allèle qui est couramment présent chez les populations sauvages, contrairement aux allèles présents chez les souches de laboratoire ou en présence de conditions pathologiques
- d) un allèle qui confère un phénotype normal dans certaines conditions mais confère un phénotype différent, muté, quand les conditions telle une température élevée sont présentes

5. Lequel des processus de développement de base suivant est le plus dépendant des mouvements cellulaires ?

- a) la différenciation cellulaire
- b) la croissance
- c) la morphogenèse
- d) l'élaboration du patron

6. Quelle forme de régulation cellulaire intervient après qu'une protéine a été synthétisée ?

- a) modification post-traductionnelle
- b) maturation de l'ARN
- c) contrôle transcriptionnel
- d) contrôle traductionnel

7. Quel terme pourrait être utilisé pour rendre compte d'un segment d'ADN ?

- a) module de *cis*-régulation
- b) expression génique différentielle
- c) protéine de régulation génique
- d) facteur de transcription

8. Un morphogène est

- a) une cellule ou un groupe de cellules qui indique à d'autres cellules de se déterminer dans une voie spécifique
- b) un gène qui pousse une cellule ou un groupe de cellules à adopter une forme particulière
- c) une molécule de signalisation qui entraîne la différenciation des cellules voisines
- d) une molécule de signalisation qui confère une information de position dépendante de la concentration

9. Qu'est-ce qui distingue les cellules souches des autres types cellulaires ?

- a) Bien que tous les types cellulaires puissent se diviser, seules les cellules souches se différencient après division.
- b) Les cellules souches sont capables de se diviser pour produire des populations de cellules qui se différencient en un ensemble de cellules du même type.
- c) Les cellules souches se divisent de façon asymétrique pour générer une cellule fille qui demeure une cellule souche et une seconde cellule fille qui se différencie en un ou plusieurs types cellulaires.
- d) Les cellules souches ont un type particulier de division cellulaire par lequel elles forment de petites tiges qui se détachent pour donner ensuite la cellule fille

10. Comment le développement de l'organisme évolue-t-il pour donner naissance à des formes ou des espèces nouvelles ?

- a) Une structure comme la nageoire d'un poisson évolue en une structure comme la main humaine par la nécessité pour l'organisme d'avoir une main plutôt qu'une nageoire.
- b) Des changements dans les gènes qui seront favorisés par la sélection naturelle seront induits, et ils produiront ainsi des changements favorables dans le développement.
- c) Des changements dans les gènes perturberont le développement d'un organisme, et si les nouveaux patrons du développement sont favorisés par l'environnement, ils seront retenus par la sélection naturelle
- d) Les caractéristiques acquises par l'organisme pendant sa vie sont transmises à sa descendance ; si les changements sont favorables à l'organisme, ils seront finalement mis en code dans les gènes qui gouvernent le développement

Réponses aux QCM

1 : d, 2 : c, 3 : d, 4 : a, 5 : c, 6 : a, 7 : a, 8 : d, 9 : c, 10 : c.

Références bibliographiques

Les origines de la biologie du développement

- De Robertis, E.M. : **Spemann's organizer and the self-regulation** of embryonic fields. *Mech Dev.* 2009, **126** : 925–941.
- Hamburger, V. : *The Heritage of Experimental Embryology : Hans Spemann and the Organizer*. New York : Oxford University Press, 1988.
- Harris, H. : *The Birth of the Cell.* New Haven : Yale University Press, 1999.
- *Milestones in Development* [http://www.nature.com/milestones/ development/index.html] (accessible à la date du 15 janvier 2017).
- Needham, J. : *A History of Embryology*. Cambridge : Cambridge University Press, 1959.
- Sander, K. : 'Mosaic work' and 'assimilating effects' in embryogenesis : Wilhelm Roux's conclusions after disabling frog blastomeres. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1991, 200 : 237–239.

- Sander, K. : Shaking a concept : Hans Driesch and the varied fates of sea urchin blastomeres. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1992, 201 : 265–267.
- Spemann, H., Mangold, H. : Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *Int. J. Dev. Biol.* 2001, 45 : 13–38. [réimpression de la traduction de leur article original en allemand de 1924]

Un outil conceptuel

Alberts, B., et al. : Essential Cell Biology : An Introduction to the Molecular Biology of the Cell. 4th edn. New York : Garland Science, 2013.

Ashe, H.L., Briscoe, J. : **The interpretation of morphogen** gradients. *Development* 2006, **133** : 385–394.

Barolo, S., Posakony, J. : Three habits of highly effective signalling pathways : principle of transcriptional control by developmental cell signalling. *Genes Dev.* 2002, 16 : 1167–1181.

- Howard, M.L., Davidson, E.H. : *cis*-Regulatory control circuits in development. *Dev. Biol.* 2004, **271** : 109–118.
- Istrail, S., De-Leon, S.B., Davidson, E.H. : The regulatory genome and the computer. *Dev. Biol.* 2007, **310** : 187–195.
- Jordan, J.D., Landau, E.M., Lyengar, R. : Signaling networks : the origins of cellular multitasking. *Cell* 2000, **103** : 193–200.
- Levine, M., Tjian, R. : **Transcriptional regulation and animal diversity.** *Nature* 2003, **424 :** 147–151.
- Martindale, M.Q. : The evolution of metazoan axial properties. *Nat. Rev. Genet.* 2005, 6 : 917–927.
- Martinez Arias A., Nicholls, J., Schröter, C. : **A molecular basis for developmental plasticity in early mammalian embryos**. *Development* 2013, **140** : 3499–3510.
- Nelson, W.J. : Adaptation of core mechanisms to generate polarity. *Nature* 2003, **422** : 766–774.

Papin, J.A., Hunter, T., Palsson, B.O., Subramanian, S. : Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat. Rev. Mol. Biol.* 2005, 6: 99–111.

- Rudel, D., Sommer, R.J. : The evolution of developmental mechanisms. *Dev. Biol.* 2003, 264 : 15–37.
- Volff, J.N. (Ed.) : Vertebrate genomes. *Genome Dyn* 2006, 2 : special issue.
- Wolpert, L. : Do we understand development ? Science 1994, 266 : 571–572.
- Wolpert, L. : **One hundred years of positional information.** *Trends Genet.* 1996, **12 :** 359–364.

Xing, Y., Lee, C. : Relating alternative splicing to proteome complexity and genome evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007, 623 : 36–49.

ENCART 1E Transduction signal et voies de signalisation intracellulaire

Alberts, B., *et al.* : *Molecular Biology of the Cell*. 5th edn. New York : Garland Science, 2008.

ENCART 1F Quand le développement est défectueux

Cohen, M.M. Jr. : Holoprosencephaly : clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2006, **76 :** 658–673.

- Geng, X., Oliver, G. : Pathogenesis of holoprosencephaly. J. Clin. Invest. 2009, 119 : 1403–1413.
- Roessler, E., Muenke, M. : How a Hedgehog might see holoprosencephaly. Hum. Mol. Genet. 2003, 12 : R15–R25.
- Zaghloul, N.A., Brugmann, S.A. : The emerging face of primary cilia. *Genesis* 2011, 49 : 231–246.

2

Mise en place du plan d'organisation de la drosophile

- Cycle vital et développement général de la drosophile
- Mise en place des axes embryonnaires
- Localisation des déterminants maternels au cours de l'ovogenèse
- Mise en place de l'organisation de l'embryon précoce
- Activation des gènes pair-rule et formation des parasegments
- Gènes de polarité segmentaire et organisation des segments
- Spécification de l'identité des segments

Le développement précoce de la mouche du vinaigre Drosophila melanogaster est l'un des mieux décrit du règne animal. Il illustre parfaitement un grand nombre des principes introduits dans le Chapitre 1. La génétique du développement est particulièrement bien comprise chez la drosophile, et de nombreux gènes du développement exprimés dans d'autres organismes, en particulier les vertébrés, ont été identifiés pour leur homologie avec des gènes de cette mouche. Comme chez beaucoup d'autres animaux, le développement de la drosophile est initié par des molécules maternelles stockées dans l'œuf. De leurs localisations précises dépendra la mise en place des principaux axes et régions du corps. Nous verrons comment les gradients de morphogènes maternels agissent sur les gènes du zygote pour spécifier les différentes structures antéro-postérieures et dorso-ventrales de l'embryon précoce, pour spécifier les cellules germinales et leur affectation dans l'embryon, et pour initier la partition de l'embryon en différents segments (ou métamères). Nous verrons enfin, au'un autre ensemble de gènes zygotiques, les gènes Hox, agissent le long de l'axe antéro-postérieur, pour attribuer à chaque segment son identité propre, en conformité avec les appendices portés par chaque segment chez l'adulte, comme les ailes, les pattes ou les antennes.

Il est surprenant de constater à quel point le développement d'un Homme et d'une mouche peut présenter des aspects communs, si dissemblables sont ces deux espèces sur le plan morphologique. Des découvertes majeures en biologie du développement au cours des 25 dernières années ont révélé que la plupart des gènes qui contrôlent le développement de la mouche drosophile sont similaires à ceux qui contrôlent le développement des vertébrés, et de beaucoup d'autres animaux. Il semble que lorsque l'évolution trouve un moyen satisfaisant de modeler le corps des animaux grâce à des mécanismes moléculaires particuliers, elle a tendance à utiliser ces mécanismes avec constance dans tout le règne animal, avec bien sûr des modifications spécifiques à chaque espèce. Ainsi, alors que le développement des insectes et des vertébrés pourrait sembler a priori très différent, l'étude de la drosophile a en fait beaucoup contribué à notre connaissance actuelle du développement des vertébrés.

Il y a environ 14 000 gènes codant pour des protéines chez la drosophile, ce qui est seulement deux fois le nombre de gènes présents chez un unicellulaire, la levure, et finalement moins que les 19 000 gènes estimés chez le ver microscopique nématode *Caenorhabditis elegans*, pourtant morphologiquement plus simple. Une analyse systématique récente des ARN transcrits chez la drosophile au cours du développement et chez l'adulte a cependant révélé une incidence élevée de l'épissage alternatif des ARN (voir Section 1.10) ce qui augmenterait sensiblement le nombre de protéines différentes synthétisées. De plus, environ 1 100 gènes à l'origine d'ARN fonctionnels distincts des ARNm, tels que les ARN te les microARN (voir Encart 6C), sont présents dans le génome de la mouche. De cette façon, la quantité et la diversité des supports de l'information génétique chez la drosophile sont plus que suffisantes pour spécifier un nombre de types cellulaires supérieur à celui du nématode et assurer à cette mouche un comportement plus complexe.

La place prééminente de la drosophile en biologie du développement a été reconnue par l'attribution en 1995 du prix Nobel de physiologie pour le travail qui a permis de comprendre comment les gènes contrôlent le développement de l'embryon de drosophile, consacrant pour la deuxième fois seulement dans l'histoire du Nobel la biologie du développement. Alors que le développement des insectes et des vertébrés peut sembler être très différent de prime abord, beaucoup des enseignements collectés chez la mouche s'appliquent également aux vertébrés ; par exemple, de nombreuses voies de signalisation intercellulaires chez l'embryon sont communes aux insectes et aux vertébrés.

La première partie de ce chapitre traite du cycle vital de la drosophile et des aspects généraux de son développement. Les parties suivantes décrivent plus précisément des étapes clefs du développement, depuis la mise en place initiale du plan d'organisation de l'embryon, jusqu'au stade où les segments se forment et acquièrent une identité unique. D'autres aspects du développement de la drosophile, tels la gastrulation, la détermination du sexe, le développement du système nerveux et de certains organes, seront abordés dans les Chapitres 9, 10, 11, 12, 13 et 14.

Cycle vital et développement général de la drosophile

La drosophile est un petit insecte diptère, d'environ 3 mm de long à l'âge adulte. Son développement embryonnaire se déroule dans un œuf et aboutit à la formation d'une larve qui sera libérée après éclosion. La larve initiale (stade larvaire 1) se transforme aux cours de deux stades de croissance successifs (stades larvaires 2 et 3) devenant à chaque fois plus grosse, et se transforme finalement en une chrysalide (ou pupe), à partir de laquelle la métamorphose en adulte peut se produire. Le cycle vital de la drosophile est représenté dans la Fig. 2.1.

2.1 L'embryon précoce de drosophile est un syncytium

L'œuf de drosophile est plutôt oblong et sa future extrémité antérieure est facilement identifiable grâce à la présence du micropyle, une structure en forme de mamelon dans la couche externe dure entourant l'œuf et qui constitue la voie d'accès du spermatozoïde à l'ovule au moment de la fécondation. Après la fécondation, et la fusion des noyaux du spermatozoïde et de l'ovule, le noyau du zygote subit une série de divisions mitotiques rapides, une toutes les neuf minutes. Contrairement à la plupart des autres espèces, il n'y a initialement pas de clivage du cytoplasme et aucune formation de membranes cellulaires ne se produit pour séparer les noyaux. Le résultat après 12 divisions nucléaires est un **syncytium** dans lequel environ 6 000 noyaux partagent un même cytoplasme (Fig. 2.2). L'embryon se présente ainsi essentiellement comme une cellule unique au cours de son développement précoce. Après neuf divisions les noyaux se déplacent vers la périphérie et le **blastoderme syncytial** est formé. Ce dernier comprend une couche superficielle de noyaux et du cytoplasme, et entoure une masse centrale de réserves vitellines cytoplasmiques. Le stade blastoderme syncytial

micropyle



25°C

Fig 2.1 Cycle de vie de la drosophile *Drosophila melanogaster.* Après le clivage et la gastrulation, l'embryon devient segmenté et

donne à l'éclosion une larve capable de s'alimenter. Ce premier stade larvaire est suivi de deux autres stades correspondant à des phases de croissance ponctuées par une mue, la dernière donnant une nymphe qui va se métamorphoser en mouche adulte. Les photographies sont prises à partir d'observations au microscope électronique à balayage. En haut : un œuf de la drosophile avant la fécondation. Le spermatozoïde entre par le micropyle. Les filaments dorsaux (rubans blancs) sont des structures extra-embryonnaires. Au centre : larve de premier stade. En bas : une pupe. La région antérieure est à gauche, et la larve et la pupe sont montrées en vue dorsale. Barre d'échelle = 0,1 mm.

En haut : photographie reproduite avec l'autorisation de Turner, F.R., Mahowald, A.P. : **Scanning electron microscopy of Drosophila embryogenesis. I. The structure of the egg envelopes and the formation of the cellular blastoderm**. Dev. Biol. 1976, **50** : 95-108. Au milieu : photographie reproduite avec l'autorisation de Turner, F.R., Mahowald, A.P. : **Scanning electron microscopy of Drosophila melanogaster embryogenesis. III. Formation of the head and caudal segments**. Dev. Biol. 1979, **68** : 96-109.



Fig. 2.2 Clivage de l'embryon de drosophile. Après la fusion des noyaux du spermatozoïde et de l'ovule, il y a des divisions nucléaires rapides, mais aucune membrane cellulaire n'entoure les noyaux individuels, ce qui entraîne la formation d'un syncytium formé de nombreux noyaux dans un cytoplasme commun. Après la neuvième division, les noyaux se déplacent vers la périphérie pour former le

blastoderme syncytial, mais certains d'entre eux sont retardés. Environ trois heures après la ponte, les membranes cellulaires se développent, donnant lieu au blastoderme cellulaire. Environ 15 cellules polaires, qui donneront naissance à des cellules germinales, forment un groupe distinct à l'extrémité postérieure de l'embryon. Les temps indiqués correspondent à une incubation à 25 °C.



Fig. 2.3 Gastrulation chez la drosophile. La gastrulation commence lorsque le futur mésoderme (en rouge) s'invagine dans la région ventrale, formant d'abord un sillon puis un tube internalisé (en rouge). Les cellules mésodermiques quittent alors le tube et migrent sous l'ectoderme (dernier schéma). Le système nerveux provient de cellules qui quittent la surface du blastoderme ventral et forment une couche entre l'ectoderme ventral restant et le mésoderme. Les régions rayées en bleu clair et bleu foncé représentent le tissu ectodermique qui produira à la fois le système nerveux (neuroectoderme, en bleu foncé) et l'épiderme (en bleu clair). La zone rayée antérieure donne naissance à une partie du cerveau et à l'épiderme de la tête. L'intestin moyen se forme à partir de deux invaginations endodermiques aux extrémités antérieure et postérieure de l'embryon, qui fusionneront au milieu (jaune). Les parties antérieure et postérieure du tube digestif sont en revanche d'origine ectodermique. L'amnioséreuse (en vert), une membrane extra-embryonnaire, est décrite dans la Section 2.5.

correspond au stade blastula des embryons d'autres espèces, par exemple le xénope (voir Encart 1A). Peu de temps après, les membranes cellulaires se développent depuis la surface pour enfermer les noyaux et former des cellules distinctes ; le blastoderme devient complètement cellulaire après 14 mitoses. En raison de la formation d'un syncytium, de grandes molécules telles que les protéines peuvent diffuser entre les noyaux au cours des trois premières heures de développement, ce qui est d'une grande importance pour le développement précoce de la drosophile, comme cela sera vu plus loin.

Au stade syncytial, un petit nombre de noyaux se déplace vers l'extrémité postérieure de l'embryon et s'entoure de membranes cellulaires, formant les **cellules polaires**, qui finissent sur la surface externe du blastoderme (cf. Fig. 2.2). Les cellules polaires donnent naissance aux cellules germinales à partir desquelles les gamètes (spermatozoïdes et ovules), se développent dans l'insecte adulte, alors que le blastoderme donne naissance aux cellules somatiques de l'embryon. Cette séparation entre lignée germinale et somatique à un stade très précoce du développement représente une stratégie commune chez les espèces animales.

Dans ce chapitre, sera abordé le développement de l'embryon jusqu'au stade larvaire qui est atteint après l'éclosion. Des méthodes expérimentales simples permettent de dégager l'embryon de ses enveloppes, qui sont opaques, afin de l'observer aux différents stades de son développement sans que cela n'altère sa structure ou ne compromette sa survie. L'embryon mesure environ 0,5 mm de long.

2.2 La cellularisation est suivie de la gastrulation et la segmentation

Tous les futurs tissus, à l'exception des cellules germinales, dérivent de la couche épithéliale unique du blastoderme cellulaire. Elle produit les trois feuillets embryonnaires, l'**ectoderme**, le **mésoderme** et l'**endoderme** (voir Encart 1C). Chez la drosophile, le mésoderme est situé initialement dans la région la plus ventrale de l'embryon, tandis que l'intestin moyen dérive de deux territoires endodermiques situés, aux extrémités antérieure et postérieure de l'embryon. Les tissus mésodermiques et endodermiques se déplacent vers leurs positions futures à l'intérieur de l'embryon au cours de la **gastrulation**, laissant l'ectoderme former la couche la plus externe (Fig. 2.3). La gastrulation commence environ trois heures après la fécondation, lorsque le futur mésoderme dans la région ventrale s'invagine pour former un sillon, le long de la ligne médiane ventrale. Les cellules mésodermiques sont d'abord internalisées formant un tube de mésoderme, qui sera décrit plus en détail dans le Chapitre 9. Elles migrent ensuite à différents endroits de l'embryon et formeront plus tard les muscles et différents tissus conjonctifs.

Chez les insectes, comme chez tous les arthropodes, le système nerveux est ventral, contrairement aux vertébrés où il est dorsal. Peu de temps après l'invagination du mésoderme, les cellules ectodermiques de la région ventrale à l'origine du système nerveux, quittent individuellement la surface de l'embryon et forment une couche de futures cellules neurales (les neuroblastes) entre le mésoderme et l'ectoderme externe restant (voir Fig. 2.3, dernier schéma). Dans le même temps, deux invaginations endodermiques en forme de tube se développent antérieurement et postérieurement. Ces invaginations s'étendent en profondeur l'une vers l'autre et, finalement, fusionnent pour former l'intestin moyen. Elles entraînent également à leur suite des cellules ectodermiques qui formeront l'intestin antérieur et l'intestin postérieur. L'ectoderme externe évolue en épiderme et continue à se diviser pendant la gastrulation, contrairement au mésoderme. Ce n'est qu'une fois la gastrulation terminée, que les cellules du mésoderme commencent à se diviser à nouveau. Les cellules de l'épiderme se diviseront encore deux fois avant de sécréter une cuticule mince composée en grande partie de protéines et de chitine, un polysaccharide.

Au cours de la gastrulation, la partie centrale du blastoderme ou **bandelette germinative**, qui comprend la majeure partie du tronc de l'embryon, est soumise à un processus d'extension le long de l'axe antéro-postérieur (Fig. 2.4). L'**extension de la bandelette germinative** entraîne les régions postérieures du tronc autour de l'extrémité postérieure sur ce qui était la face dorsale, comme cela est décrit au Chapitre 9. La bandelette germinative se rétracte à la fin du développement embryonnaire. Au moment de l'extension de la bandelette germinative,



les premiers signes extérieurs de la **segmentation** apparaissent. Une série de sillons régulièrement espacés se forment plus ou moins simultanément et ceux-ci délimitent des régions répétées appelées **parasegments**. Comme nous le verrons plus loin, les segments de la larve et de l'adulte ne correspondent pas exactement aux parasegments embryonnaires et se formeront par fusion des parties postérieure et antérieure de parasegments adjacents. Il y a quatorze parasegments : trois contribuent aux parties buccales de la tête ; trois à la région thoracique ; et huit à l'abdomen.

2.3 Après l'éclosion, la larve de drosophile se développe à travers différents stades larvaires, forme une pupe, puis se métamorphose en adulte

La larve (Fig. 2.5) éclot environ 24 heures après la fécondation, mais les différentes régions du corps larvaire sont déjà bien définies plusieurs heures auparavant. La tête est une structure complexe peu identifiable avant l'éclosion. L'acron correspond à la structure la plus antérieure de la tête et le telson marque, lui, l'extrémité postérieure de la larve. Entre la tête et le telson, trois segments thoraciques et huit segments abdominaux peuvent être distingués grâce à des spécialisations de la cuticule. Sur la face ventrale de chaque segment, on observe des ceintures de petites excroissances semblables à des dents appelées **denticules**, et d'autres structures cuticulaires caractéristiques de chaque segment. À mesure que la larve se nourrit et se développe, elle subit des mues, perdant à chaque fois sa cuticule. Ce processus se produit deux fois, chaque étape générant un **stade larvaire** spécifique. Après le troisième stade larvaire, la larve devient une **pupe**, au sein de laquelle se produit alors une transformation majeure de la forme globale de l'insecte avec la **métamorphose** en mouche adulte.

L'embryon de drosophile n'a ni ailes ni pattes ; celles-ci comme d'autres organes, sont formées en fin de développement larvaire (Chapitre 13). Les ébauches de ces structures sont cependant formées dans l'embryon et sont présentes dans la larve sous forme de **disques imaginaux**, constitués initialement d'environ 20 à 40 futures cellules épidermiques. Ces disques se développent grâce à une prolifération cellulaire tout au long de la vie larvaire et forment des sacs épithéliaux qui se replient pour compenser l'augmentation de leur taille. Il existe des disques imaginaux pour chacune des six pattes, des deux ailes et des deux balanciers (organes d'équilibrage), ainsi que pour l'appareil génital, les yeux, les antennes, et d'autres structures de la tête adulte (Fig. 2.6). À la métamorphose, ces disques imaginaux sera discuté au Chapitre 11 ; ils assurent une continuité entre la morphologie de la larve et celle de l'adulte, en dépit de la métamorphose.

2.4 De nombreux gènes du développement ont été identifiés chez la drosophile par criblage génétique à grande échelle

Les mutations spontanées porteuses d'informations utiles pour l'étude du développement sont rares. La plupart des gènes de développement connus ont été identifiés **Fig. 2.4 Gastrulation, extension de la bandelette germinative et segmentation de l'embryon de drosophile.** La gastrulation consiste en un déplacement interne du futur mésoderme à travers le sillon ventral. Pendant la gastrulation, la partie centrale du blastoderme (la bandelette germinative) s'étend, entraînant la région postérieure du tronc vers le côté dorsal de l'embryon. La fin de cette étape coïncide avec le début de la segmentation. Plus tard, la bande germinative raccourcit. Barre d'échelle = 0,1 mm.

Reproduit avec l'autorisation de Turner, F.R., Mahowald, A.P. : Scanning electron microscopy of Drosophila melanogaster embryogenesis. II. Gastrulation et segmentation. Dev. Biol. 1977, 57 : 403-416.





Fig. 2.5 Premier stade larvaire de la drosophile. Vue ventrale. T1 à T3 sont les segments thoraciques, et A1 à A8 les segments abdominaux. Un profil caractéristique des denticules peut être observé dans la région antérieure de chaque segment abdominal. Barre d'échelle = 0,1 mm.

Photographie aimablement communiquée par F.R. Turner.



en induisant aléatoirement des mutations chez un grand nombre d'individus par des traitements chimiques ou par irradiation avec des rayons X, et ensuite par l'identification de ceux présentant des défauts de développement associés à des mutations dans des gènes individuels. Cette approche est fructueuse avec les organismes, comme la drosophile, qui se reproduisent rapidement et peuvent être obtenus et traités en très grand nombre. L'objectif global de l'expérience est de traiter une population assez grande pour qu'une mutation soit induite dans chaque gène du génome.

La compréhension actuelle du développement précoce chez la drosophile provient d'une étude fructueuse de criblage de gènes visant à identifier dans le génome de la drosophile les mutations affectant la structure de l'embryon précoce. Cette étude, par son importance, a valu le Prix Nobel de Physiologie et Médecine à Edward Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard, et Eric Wieschaus en 1995.

Dans ce programme de criblage, des milliers de mouches ont été traitées avec un mutagène chimique, et ont été élevées et sélectionnées selon la stratégie décrite dans l'Encart 2A. Étant donné le nombre de descendants impliqués, il était important de mettre au point une stratégie qui permettait de réduire le nombre de mouches qui devaient être examinées pour trouver une mutation. Donc, la recherche a été limitée à des mutations sur un seul chromosome à la fois et en faisant usage d'un système qui permettait d'éliminer les mouches sans intérêt pour le criblage. Comme cela est décrit dans l'Encart 2A, la stratégie comprenait un moyen d'identifier les mouches homozygotes pour les mutations induites portées par les chromosomes issus des mâles et également une procédure pour éliminer automatiquement à partir de la population des mouches, celles qui n'étaient pas porteuses d'un chromosome muté.

La disposition précise et constante des denticules de la cuticule à la fin de l'embryogenèse (voir Fig. 2.5) a été particulièrement utile au cours du criblage pour identifier les variations induites par les mutations. Les criblages ont permis d'identifier des différences dans le nombre de segments, ainsi que dans l'agencement des denticules (voir Encart 2A). De cette manière, des gènes clés impliqués dans la formation de l'embryon précoce de la drosophile, ont été identifiés pour la première fois. Les criblages ont également permis d'identifier des gènes impliqués dans la spécification des feuillets embryonnaires, ainsi que des gènes affectant les mitoses et le cycle cellulaire.

Un type particulier de mutation touchant le développement embryonnaire de la drosophile nécessite un criblage particulier. Il s'agit des **mutations à effet maternel** qui affectent le développement de l'embryon *via* la mère. Ces mutations n'affectent ni l'apparence ni la physiologie normale de la mère, mais induisent des effets conséquents sur le développement de sa progéniture et ceci indépendamment de la contribution du père puisque le génome paternel ne peut pas contrebalancer le défaut apporté par la mère. Les criblages de ce type particulier de mutations ont conduit à

Fig. 2.6 Les disques imaginaux donnent naissance à des structures adultes à la métamorphose. Les disques imaginaux de la larve de drosophile sont de petites lames de cellules épithéliales. A la métamorphose ils donnent naissance à une variété de structures adultes. La cuticule abdominale de l'adulte provient de groupes de cellules tissulaires, les histoblastes, situés dans chaque segment abdominal larvaire.

ENCART 2A Mutagenèse et stratégie de criblage génétique pour identifier des mutants de développement chez la drosophile

Le mutagène méthanesulfonate d'éthyle (EMS, pour *Ethyl Methane Sulfonate*) a été appliqué à un grand nombre de mouches mâles homozygotes pour une mutation récessive mais viable (par exemple, les yeux blancs au lieu des yeux rouges normaux, voir Fig. 1.12) sur le chromosome sélectionné noté « a » dans la Figure 1.

Les mâles traités, qui produisent maintenant des spermatozoïdes avec diverses mutations induites sur ce chromosome (a*), ont été croisés avec des femelles non traitées qui portaient des mutations différentes (DTS et b) sur leurs deux chromosomes « a », mais étaient de type sauvage pour le reste. Ces mutations permettent de suivre les chromosomes de la femelle et d'éliminer tous les embryons porteurs de deux chromosomes provenant de la femelle. DTS est une mutation dominante thermosensible qui tue les mouches placées à 29 °C, tandis que b est une mutation récessive létale embryonnaire sans phénotype visible qui permet donc l'élimination des embryons ne portant pas le chromosome a*. Les mouches femelles portaient également un chromosome balanceur particulier (non représenté) empêchant la recombinaison des chromosomes mâles et femelles.

Pour identifier les nouvelles mutations

récessives (a*) causées par le traitement chimique, un grand nombre de mâles hétérozygotes issus de ce premier croisement a été croisé à des femelles *DTS/b*. Parmi les descendants de chaque croisement, seules les mouches a*/b survivent lorsqu'elles sont placées à 29 °C ; toutes les autres combinaisons meurent. Les frères et sœurs survivants de chaque croisement portent la même mutation a*. Ils ont été croisés entre eux et les descendants testés pour la présence de mutations affectant la morphologie de la larve. Il y a trois catégories de descendants : les homozygotes pour la mutation induite a*; les hétérozygotes a*/b; et les homozygotes b (qui meurent mais ne présentent pas d'anomalie morphologique).

Les mutations a* qui affectent la morphologie des larves sont létales, donc des tubes de culture contenant les mouches adultes



Figure 1

aux yeux blancs peuvent être éliminées de l'analyse puisque leurs mutations a* leur ont permis de se développer jusqu'à l'âge adulte, même à l'état homozygote. S'il n'y a pas de mouches aux yeux blancs dans un tube, il en résulte que les embryons homozygotes a*/a* sont morts ou arrêtés dans leur développement en raison d'un développement anormal, et la mutation est donc potentiellement intéressante. Les embryons ou les larves de ce croisement peuvent ensuite être examinés pour des défauts de morphologie, comme dans les exemples illustrés ici (Figure 2). Les adultes de type sauvage dans ce tube sont hétérozygotes pour a* et sont utilisés comme reproducteurs pour étudier le mutant de manière plus approfondie. L'ensemble de ce programme a été répété pour chacune des quatre paires de chromosomes de la drosophile.



Figure 2

l'identification des gènes responsables et des protéines qu'ils codent. Comme il sera vu plus loin dans le chapitre, certains de ces gènes à effet maternel sont exprimés et agissent dans les cellules folliculaires de l'ovaire, qui forment un sac contenant les cellules d'origine germinale, l'ovocyte et les cellules nourricières. D'autres gènes sont exprimés par ces dernières, qui mettent leur cytoplasme et leurs noyaux au service de l'ovocyte, ou par l'ovocyte lui-même. Ces ARNm et protéines d'origine maternelle vont être déposés dans l'ovocyte selon une distribution spatiale particulière qui sera cruciale pour permettre un développement normal.

RÉSUMÉ

L'embryon de la mouche du vinaigre, la drosophile, se développe à l'intérieur d'enveloppes protectrices et après éclosion devient une larve. Celle-ci passe par plusieurs cycles de croissance et de mue avant de former une pupe et subir une métamorphose pour produire la mouche adulte. Les protéines et ARNm maternels déposés dans l'œuf conditionnent les premiers stades de développement, et il sera examiné comment ces produits maternels contrôlent la formation des axes antéro-postérieurs et dorso-ventraux de l'embryon.

Mise en place des axes embryonnaires

Le corps de l'insecte, comme celui des vertébrés et la plupart des autres organismes décrits dans ce livre, présente une symétrie bilatérale. Comme toutes les espèces avec une symétrie bilatérale, la larve de drosophile a deux axes distincts et largement indépendants : les axes antéro-postérieur et dorso-ventral qui sont perpendiculaires l'un à l'autre. Ces axes sont déjà partiellement mis en place dans l'œuf de la drosophile, et comment ils s'établissent et commencent à être modelés dans le très jeune embryon est considéré ici.

2.5 Les axes corporels sont établis alors que l'embryon de la drosophile n'est encore qu'un syncytium

Les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont pleinement définis et commencent à se différencier alors que l'embryon est encore au stade blastoderme syncytial. L'embryon se divise en plusieurs grandes régions suivant l'axe antéro-postérieur, qui deviendront la tête, le thorax et l'abdomen de la larve (Fig. 2.7). Le thorax et l'abdomen se divisent en segments quand l'embryon se développe, tandis que les deux régions de l'endoderme à chaque extrémité de l'embryon s'invaginent lors de la gastrulation, pour former le tube digestif (voir Fig. 2.3). Chaque segment et la tête, ont un caractère unique dans la larve, révélé par leurs structures cuticulaires externes et leur organisation interne.

L'axe dorso-ventral de l'embryon se divise en quatre régions au début de l'embryogenèse : depuis la position ventrale jusqu'à la position dorsale s'observent successivement le **mésoderme**, qui formera les muscles et d'autres tissus conjonctifs internes, l'**ectoderme ventral** ou **neuroectoderme**, qui donnera naissance au système nerveux et à de l'épiderme larvaire, l'**ectoderme dorsal**, à l'origine de l'épiderme de la larve, et l'**amnioséreuse**, une membrane extra-embryonnaire sur la face dorsale de l'embryon (Figs 2.3 et 2.7). Les axes antéro-postérieur et dorso-ventral de l'embryon précoce se développent plus ou moins simultanément, mais sont spécifiés par des mécanismes indépendants et par différents ensembles de gènes.

Le développement précoce de la drosophile est propre à certains types d'insectes, l'organisation corporelle commençant à se mettre en place à partir d'un blastoderme syncytial (voir Fig. 2.2). La Figure 2.8 montre un embryon au stade de blastoderme syncytial avec les noyaux marqués par deux facteurs de transcription maternels. C'est seulement après le début de la segmentation que l'embryon devient vraiment multicellulaire. Au stade syncytial, de nombreuses protéines, y compris des facteurs de transcription qui ne sont normalement pas sécrétés à partir de cellules, peuvent diffuser à travers le blastoderme et entrer dans les noyaux. Ceci permet la formation de gradients de concentration de facteurs de transcription le long de l'embryon, qui génèrent des informations de position interprétables par les noyaux (Section 1.15).

Le développement précoce est essentiellement bidimensionnel, car les structures embryonnaires sont établies dans le blastoderme, qui n'est au départ qu'une simple monocouche de noyaux, et un peu plus tard de cellules. Mais la larve elle-même est



Fig. 2.7 Mise en place du plan d'organisation de l'embryon de drosophile. Le plan du corps est structuré selon deux axes distincts. Les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont perpendiculaires l'un à l'autre et sont mis en place dans l'œuf. Au début du développement, l'axe dorso-ventral est subdivisé en quatre régions : mésoderme (en rouge), ectoderme ventral ou neuroectoderme (en bleu foncé), ectoderme dorsal (en bleu clair) et une membrane extra-embryonnaire, l'amnioséreuse (en vert). L'ectoderme ventral produit à la fois de l'épiderme ventral et le tissu neural. L'ectoderme dorsal donne naissance à l'épiderme. L'axe antéro-postérieur se subdivise en différentes régions qui donnent plus tard naissance à la tête, au thorax et à l'abdomen. Après la subdivision initiale en grandes régions du corps, la segmentation commence. Les futurs segments peuvent être visualisés sous forme de bandes transversales par coloration pour des expressions géniques spécifiques. Ces bandes délimitent 14 parasegments, dont 10 sont indiqués dans ce schéma. L'embryon se développe en larve segmentée. Après la mue de la première larve, les 14 parasegments ont été convertis en trois segments thoraciques (T1-T3) et huit abdominaux (A1-A8), chaque segment étant constitué de la moitié postérieure d'un parasegment et la moitié antérieure du suivant. Le reste des parasegments contribue aux structures de la tête. Différents segments se distinguent par des patrons particuliers de structures cuticulaires comme des « poils » et des denticules. Des structures spécialisées, l'acron et le telson, se développent aux extrémités, respectivement, antérieure et postérieure de l'embryon.



Fig. 2.8 La mise en forme des structures de l'embryon commence au stade

blastoderme syncytial. La photographie montre un embryon environ 2 heures après la ponte, dans lequel deux protéines maternelles traduites, les facteurs de transcription Bicoïd (en vert) et Caudal (en rouge), sont entrées dans les noyaux de l'embryon. Ces protéines sont impliquées dans le modelage de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. La protéine Bicoïd empêche la synthèse de la protéine Caudal à l'extrémité antérieure de l'embryon, restreignant ainsi Caudal à l'extrémité postérieure. L'embryon a été fixé et la présence des protéines a été révélée en utilisant des anticorps fluorescents.

Reproduit avec l'autorisation de Surkova, S., et al. : **Characterization of the Drosophila segment determination morphome**. Dev. Biol. 2008, 313 : 844-862.



Film montrant le gradient de Bicoïd chez la drosophile un objet en trois dimensions, avec des structures internes organisées le long des axes. Cette troisième dimension se développe plus tard, lors de la gastrulation (Chapitre 9), lorsque des parties de la couche superficielle se déplacent à l'intérieur, pour former l'intestin, les structures mésodermiques qui donneront des muscles, et le système nerveux issu de l'ectoderme (voir Fig. 2.3).

2.6 Des facteurs maternels mettent en place les axes et contrôlent le développement initial de la drosophile

Le début du développement embryonnaire chez la drosophile est orchestré par des **facteurs maternels**, des ARNm et protéines, qui sont synthétisés et déposés dans l'œuf par la mère (Section 2.4). L'analyse génétique a identifié environ 50 gènes maternels impliqués dans la mise en place des deux axes et dans la formation d'un réseau moléculaire d'informations de position, qui est ensuite interprété par le propre programme génétique de l'embryon. Contrairement aux gènes à effet maternel, les gènes exprimés dans les noyaux de l'embryon au cours du développement sont nommés **gènes zygotiques**. Toute modification embryonnaire ultérieure impliquant l'expression régulée des gènes zygotiques, sera construite sur la base des instructions spatiales initialement fournies par l'expression des gènes maternels (Fig. 2.9). Après la fécondation, les ARN maternels sont traduits et les protéines correspondantes, principalement des facteurs de transcription, agissent sur les noyaux de l'embryon pour activer l'expression des gènes zygotiques selon un profil spatial spécifique le long de chaque axe, préparant ainsi la prochaine série de modifications embryonnaires.

L'étude de la drosophile illustre parfaitement un principe général du développement qui est que l'embryon est modelé progressivement au cours d'une série d'étapes successives. Des différences régionales grossières sont d'abord mises en place chez l'embryon. Les régions ainsi délimitées sont ensuite fractionnées en un plus grand nombre de domaines caractérisés individuellement par un profil unique d'activité et d'interactions géniques. Les gènes du développement agissent suivant une séquence temporelle stricte. Ils établissent entre eux une hiérarchie génique telle que l'activité d'une série de gènes conditionne celle d'une autre série de gènes, et ainsi le passage à l'étape suivante du développement.

2.7 Trois classes de gènes maternels spécifient l'axe antéro-postérieur

Dans un premier temps va être examiné comment les produits de gènes maternels spécifient l'axe antéro-postérieur de l'embryon. L'expression des gènes maternels chez la mère crée des différences régionales dans l'œuf le long de l'axe antéro-postérieur avant même qu'il soit fécondé. Ces différences distinguent déjà les futures extrémités antérieure et postérieure de la larve. Les rôles des gènes maternels individuels peuvent être déduits des effets de leurs mutations (Section 2.4) sur le développement de l'embryon. Ces mutations se répartissent en trois catégories : celles qui affectent seulement les régions antérieures, ou les régions postérieures, et celles qui affectent les deux régions terminales (Fig. 2.10). Des mutations de gènes de la classe antérieure, tel que *bicoïd*, conduisent à une diminution ou à une perte de la tête et du thorax de la larve, et dans certains cas, leur remplacement par des structures postérieures. Des mutations de gènes postérieures, comme *nanos*, provoquent la perte des régions abdominales, conduisant à une larve plus petite que la normale, tandis que des mutations de gènes de type terminal, comme *torso*, affectent l'acron et le telson.

Les noms des gènes chez la drosophile correspondent généralement à la description de leur phénotype mutant : *nanos* en Grec signifie nain, *bicoïd* signifie deux extrémités, et *torso* reflète le fait que les deux extrémités de l'embryon sont manquantes. Dans ce chapitre, seront cités un certain nombre de noms de gènes et ces derniers sont répertoriés, ainsi que leurs fonctions lorsqu'elles sont connues, dans le tableau à la fin de ce chapitre.

2.8 La protéine morphogène Bicoïd est distribuée selon un gradient antéropostérieur

L'ARNm *bicoïd* maternel est localisé à l'extrémité antérieure de l'œuf non fécondé pendant l'ovogenèse. Après la fécondation, il est traduit en protéine Bicoïd qui diffuse



à partir de l'extrémité antérieure pour former un gradient de concentration décroissant suivant l'axe antéro-postérieur. La découverte du gradient de la protéine Bicoïd a constitué la première preuve expérimentale validant l'hypothèse de l'existence de gradients morphogènes capables de contrôler la formation de patrons de développement (Section 1.15).

Le rôle du gène bicoïd a été élucidé par une combinaison d'expériences de génétique et d'embryologie classique chez l'embryon de drosophile. Les mouches femelles qui n'expriment pas bicoïd produisent des embryons avec une tête et un thorax anormaux (Fig. 2.10). Dans une série distincte d'expériences sur le rôle des facteurs cytoplasmiques localisés dans le développement de la région antérieure, des œufs normaux ont été percés au niveau de leur extrémité antérieure permettant à un peu de cytoplasme de s'écouler vers l'extérieur. Les embryons issus de ces œufs ressemblent de manière frappante aux embryons mutants bicoïd. L'ensemble de ces observations a suggéré que les œufs normaux présentaient un ou des facteur(s) dans le cytoplasme antérieur qui était(ent) absent(s) dans les œufs mutants bicoïd. Ceci fut confirmé en montrant que le cytoplasme antérieur prélevé dans des embryons de type sauvage pouvait partiellement restaurer un développement de type sauvage chez les mutants bicoïd, lorsque ce cytoplasme était injecté dans leur région antérieure (Fig. 2.11). Par ailleurs, si le cytoplasme antérieur normal était injecté au centre d'un œuf mutant *bicoïd* fécondé, les structures de la tête se développaient au niveau du site d'injection et les segments adjacents devenaient des segments thoraciques, créant une image en

Fig. 2.9 L'expression séquentielle de différents ensembles de gènes établit le plan du corps le long de l'axe antéropostérieur. En haut : après la fécondation, des produits d'origine maternelle déposés dans l'œuf, tel que l'ARNm bicoïd (en rouge), sont traduits. Une fois traduite, la protéine Bicoïd diffuse et sa concentration le long de l'axe antéro-postérieur fournit une information de position qui active les gènes zygotiques (le gradient de la protéine Bicoïd est montré dans les Figs. 2.8 et 2.12). Schémas du bas : les quatre principales classes de gènes zygotiques agissant le long de l'axe antéro-postérieur sont les gènes gap, les gènes pair-rule, les gènes de polarité segmentaire et les gènes sélecteurs homéotiques. Les gènes gap définissent des différences régionales, qui aboutissent à des patrons d'expression périodique des gènes pair-rule, lesquels définissent les parasegments et préfigurent la segmentation. Les gènes de polarité segmentaire génèrent des informations de position précises à l'intérieur des parasegments, nécessaires à la formation des segments futurs, et les gènes sélecteurs homéotiques déterminent l'identité des segments (si un segment est thoracique ou abdominal, par exemple, et quel segment spécifique il est en particulier). Les fonctions de chacune de ces classes de gènes sont discutées dans ce chapitre.



miroir du corps au site d'injection. L'interprétation la plus simple de ces expériences est que le gène *bicoïd* est nécessaire pour la mise en place des structures antérieures, car il établit un gradient de protéines Bicoïd, dont la source et le niveau le plus élevé se trouvent à l'extrémité antérieure.

On a pu montrer que l'ARNm *bicoïd* avait une localisation très précise dans la région la plus antérieure de l'œuf non fécondé grâce à la technique d'hybridation *in situ* (Encart 1D). La détection de la protéine Bicoïd avec un anticorps spécifique a révélé que la protéine était absente de l'œuf fécondé, mais présente après fécondation au pôle antérieur. La protéine diffuse ensuite depuis cette région et forme un gradient de concentration antéro-postérieur décroissant, son niveau le plus élevé étant situé à l'extrémité antérieure. *Bicoïd* est un facteur de transcription et doit donc entrer dans les noyaux de l'embryon pour mener à bien sa fonction de stimulateur de l'expression des gènes zygotiques. Au moment où le blastoderme syncytial est formé, il existe un gradient de concentration nucléaire de Bicoïd bien visible le long de l'axe antéro-postérieur, et celui-ci culmine à l'extrémité antérieure.

Avec les progrès de l'imagerie, la dynamique de la formation du gradient de concentration de Bicoïd a été étudiée dans les embryons vivants en mesurant les concentrations intranucléaires de protéines Bicoïd génétiquement marquées avec la protéine fluorescente verte (Bicoïd- GFP) (Fig. 2.12). Les mesures montrent que la concentration de la protéine Bicoïd à l'intérieur d'un noyau à une position donnée le long du gradient est en quelque sorte maintenue à un niveau constant, en dépit de l'augmentation du nombre de noyaux à chaque cycle mitotique et de la sortie de Bicoïd des noyaux lorsque les enveloppes nucléaires disparaissent lors de la mitose.

La protéine Bicoïd agit comme un morphogène qui structure la partie antérieure de l'embryon. Comme cela est décrit plus en détail plus loin, la protéine active certains gènes zygotiques à différents **seuils de concentration**, générant de nouveaux profils d'expression de gènes le long de l'axe (le concept de seuils est discuté dans la Section 1.15).

Fig. 2.10 Effets des mutations des

gènes maternels. Les mutations des gènes maternels entraînent des délétions et des anomalies des structures antérieures, postérieures ou terminales. La carte des territoires présomptifs de l'embryon de type sauvage montre les différentes régions de l'œuf, et les régions et structures particulières de la larve qu'elles produisent. Les régions affectées dans les œufs mutants, et qui conduisent à la perte de structures ou à leur altération dans la larve, sont ombrées en rouge. Chez les mutants bicoïd, il existe une perte partielle des structures antérieures et l'apparition d'une structure postérieure, le telson, à l'extrémité antérieure. Les mutants nanos sont dépourvus d'une grande partie de la région postérieure. Les mutants torso n'ont ni acron ni telson.



En résumé, *bicoïd* est un gène maternel clé dans le développement précoce de la drosophile. Les autres gènes maternels du groupe antérieur sont principalement impliqués dans l'adressage de l'ARNm *bicoïd* à l'extrémité antérieure de l'œuf pendant l'ovogenèse et dans le contrôle de sa traduction après la fécondation. En dépit de l'importance de *bicoïd* pour le développement de la drosophile, il convient de noter que ce gène n'est présent que dans un groupe restreint de diptères incluant les drosophiles et les mouches à viande. Plus loin dans ce chapitre, seront examinés brièvement les différents mécanismes de développement précoces observés dans d'autres groupes d'insectes. L'apparition au cours de l'évolution de différents mécanismes de développement chez les insectes n'est pas si surprenante si on considère que ces animaux forment de très nombreux groupes diversifiés.

2.9 L'organisation postérieure est contrôlée par les gradients des protéines Nanos et Caudal

L'axe antéro-postérieur ne peut s'établir correctement que si les deux extrémités de l'embryon sont spécifiées ; or Bicoïd ne définit que l'extrémité antérieure. L'extrémité postérieure est spécifiée par l'action d'autres gènes, au nombre de neuf au moins, les gènes maternels du groupe postérieur. Des mutations de ces gènes, tels que *nanos*, provoquent le développement de larves plus courtes que la normale car dépourvues d'abdomen (Fig. 2.10). La fonction des autres gènes postérieurs (par exemple celle d'*oskar*) est de localiser les ARNm de *nanos* au pôle postérieur de l'œuf non fécondé. Une autre fonction est de concentrer des déterminants moléculaires dans le cytoplasme postérieur de l'œuf (le **plasme germinal**), qui seront incorporés dans le cytoplasme des cellules polaires, les futures cellules germinales (Section 2.1) qui deviendront des ovocytes ou des spermatozoïdes.

L'ARNm *nanos* est localisé à l'extrémité postérieure de l'œuf et, comme l'ARNm *bicoïd*, il n'est traduit qu'après la fécondation. Cette traduction génère un gradient

Fig. 2.11 Le gène bicoïd est nécessaire au développement des structures

antérieures. Les embryons dont les mères n'ont pas de gène *bicoïd* fonctionnel sont dépourvus de régions antérieures (deuxième ligne). Le transfert du cytoplasme antérieur d'embryons de type sauvage à des embryons mutants bicoïd provoque la formation de structures antérieures au niveau du site d'injection (troisième ligne). Si le cytoplasme antérieur de type sauvage est transplanté au milieu d'un œuf ou d'un embryon précoce mutant bicoïd, des structures de la tête se développent au niveau du site d'injection, flanguées des deux côtés par des segments de type thoracique (quatrième ligne). Ces résultats suggèrent que le cytoplasme antérieur est responsable d'un gradient Bicoïd décroissant depuis le site d'injection (voir les graphiques, en bas à gauche). A, antérieur ; P, postérieur.



Fig. 2.12 La protéine Bicoïd entre dans les noyaux et forme un gradient nucléaire antéro-postérieur. La photographie du haut montre le gradient de protéine Bicoïd nucléaire dans un embryon de drosophile transgénique fixé exprimant un gène de fusion bicoïd-GFP. Chez ces embryons, la concentration de la protéine Bicoïd peut être mesurée avec précision soit en mesurant l'intensité de la fluorescence naturelle de la protéine GFP (non représentée), soit en mesurant celle d'un anticorps anti-GFP marqué avec un fluorophore, ce qui est montré ici dans l'embryon vu de l'extérieur. La photographie du bas montre l'extrémité antérieure d'un embryon de drosophile transgénique fixé exprimant un gène de fusion bicoïd-GFP marqué avec des sondes d'ADNc fluorescentes se liant aux ARNm bicoïd. La couleur verte correspond à la fluorescence de la protéine GFP dans les noyaux, la couleur rouge aux paquets formés par les nombreuses molécules d'ARNm bicoïd dans le cytoplasme antérieur.

En haut : photographie aimablement communiquée par J. O. Dubuis et T. Gregor ; en bas : illustration aimablement communiquée par S. C. Little et T. Gregor. de concentration croissant de la protéine Nanos, qui dans ce cas est plus concentrée à l'extrémité postérieure de l'embryon. Mais contrairement à Bicoïd, Nanos n'est pas un facteur de transcription et ne va pas agir directement en tant que morphogène pour spécifier la région abdominale ; son action est très différente. Sa fonction est de supprimer la traduction d'un ARNm d'un autre gène maternel, *hunchback*, dans la région postérieure de l'embryon.

L'ARNm maternel *hunchback* est distribué dans tout l'embryon et ne commence à être traduit qu'après la fécondation. Cependant, *hunchback* est aussi l'un des gènes zygotiques activés par la protéine Bicoïd lors de la formation des régions antérieures de l'embryon. Le confinement de la protéine *Hunchback* dans la région antérieure est donc déterminant pour le développement correct des structures embryonnaires le long de l'axe antéro-postérieur. Pour éviter toute interférence de la protéine Hunchback maternelle dans la région postérieure, et la production de structures antérieures à cet endroit, sa traduction est inhibée postérieurement. Ceci est l'unique fonction de la protéine Nanos (Fig. 2.13.) : elle bloque la traduction de l'ARNm *hunchback* en se liant au complexe formé par cet ARNm et la protéine Pumilio codée par un des gènes du groupe postérieur. Si on retire expérimentalement la protéine Hunchback maternelle des embryons, Nanos devient complètement inutile.

L'évolution ne peut fonctionner que sur ce qui est déjà établi, et elle ne peut pas « examiner » l'ensemble du système pour le redessiner de façon économique. Donc, si un gène pose un problème en étant exprimé au mauvais endroit, le problème peut être résolu non pas en réorganisant le patron d'expression du gène, mais en créant une nouvelle fonction, comme celle de *nanos*, pour éliminer la protéine non désirée.

Un autre produit maternel crucial pour établir l'extrémité postérieure de l'axe est l'ARNm *caudal*. De nouveau, il s'agit d'un ARNm qui n'est traduit qu'après la fécondation. Il est réparti uniformément dans l'œuf, mais, après la fécondation, un gradient antéro-postérieur croissant de la protéine Caudal est établi par inhibition spécifique de la synthèse protéique de cette protéine par Bicoïd, qui se lie à la région non traduite en 3 ' de l'ARNm *caudal*. Cette fonction est tout à fait distincte de l'action de Bicoïd en tant que facteur de transcription. Étant donné que la concentration de Bicoïd est faible à l'extrémité postérieure de l'embryon, la concentration de la protéine Caudal est la plus élevée à cet endroit (voir Fig. 2.8). Des mutations du gène *caudal* conduisent à un développement anormal des segments abdominaux.

Peu de temps après la fécondation, par conséquent, plusieurs gradients de protéines maternelles ont été établis le long de l'axe antéro-postérieur. Deux gradients antéro-postérieurs décroissants, ceux des protéines Bicoïd et Hunchback, et un autre croissant, celui de la protéine Caudal. Reste à considérer maintenant le mécanisme tout à fait différent qui spécifie chacune des deux extrémités de l'embryon.

2.10 Les extrémités antérieure et postérieure de l'embryon sont déterminées par l'activation d'un récepteur membranaire

Un troisième groupe de gènes maternels spécifie les structures aux extrémités de l'axe antéro-postérieur, l'acron et la région de la tête à l'extrémité antérieure, le telson et les segments abdominaux les plus postérieurs à l'extrémité postérieure. Un gène clé dans ce groupe est *torso*, des mutations de *torso* pouvant entraîner la formation d'embryons sans acron, ni telson (Fig. 2.10). Ceci indique que les deux régions terminales, bien que distantes l'une de l'autre, utilisent un mécanisme commun pour leur formation.

Les régions terminales sont spécifiées par un mécanisme original qui implique l'activation localisée d'une protéine réceptrice qui est présente dans toute la membrane plasmique de l'œuf fécondé. Le récepteur activé émet un signal vers le cytoplasme adjacent qu'il spécifie en tant que terminal. Le récepteur est connu sous le nom de Torso car des mutations dans le gène *torso* maternel produisent des embryons dépourvus de régions terminales. Après la fécondation, l'ARNm *torso* est traduit et la protéine Torso est uniformément répartie dans la membrane plasmique des œufs fécondés. Torso est cependant activée uniquement aux extrémités de l'œuf fécondé, car le ligand protéique qui le stimule n'est présent qu'à cet endroit.


Le ligand de Torso est un fragment d'une protéine sécrétée connue sous le nom de Trunk. L'ARNm trunk est déposé dans l'ovocyte par les cellules nourricières et la protéine Trunk est sécrétée dans l'espace périvitellin au cours du développement de l'ovocyte. L'espace périvitellin est l'espace séparant la membrane plasmatique ovocytaire de la membrane protectrice constituée de matrice extracellulaire appelée **membrane vitelline** ou **enveloppe vitelline**, qui entoure l'ovocyte. La protéine Trunk est potentiellement secrétée dans tout l'espace périvitellin, mais comme les mécanismes nécessaires à la formation du fragment de Trunk ne sont présents qu'aux pôles de l'ovocyte, ce fragment est généré uniquement au niveau de ces deux régions. Cette transformation nécessite l'activité d'une protéine appelée Torso-like, qui est produite exclusivement par les cellules folliculaires adjacentes aux deux pôles de l'œuf, et est présente dans l'enveloppe vitelline aux pôles de l'œuf fécondé. Quand le développement commence après la fécondation, de petites quantités de ligand Trunk sont produites au niveau des pôles et sont présentes dans l'espace périvitellin, où une liaison à Torso peut se réaliser. Le ligand Trunk n'est produit qu'en petites quantités, donc très peu présent à l'état libre car principalement lié à Torso, ce qui empêche sa diffusion sur de longues distances. De cette manière, une zone localisée d'activation du récepteur est mise en place au niveau de chaque pôle (Fig. 2.14).

La stimulation de Torso par son ligand produit un signal qui active l'expression de gènes zygotiques dans les noyaux situés aux deux pôles, définissant ainsi les deux extrémités de l'embryon. La protéine Torso appartient à une superfamille de récepteurs transmembranaires, dits à activité tyrosine kinase, la partie cytoplasmique de ces récepteurs étant responsable de cette activité. Lorsque la partie extracellulaire du récepteur se lie à son ligand, la fonction kinase est activée et transmet un signal intracellulaire en phosphorylant des protéines cytoplasmiques.

Ce mécanisme ingénieux qui crée une activation très localisée du récepteur ne se limite pas à la détermination des régions terminales de l'embryon, mais est également utilisé dans la mise en place de l'axe dorso-ventral qui va être considérée à présent.

2.11 La polarité dorso-ventrale de l'embryon est déterminée par la localisation de protéines maternelles dans l'espace périvitellin

L'axe dorso-ventral est déterminé par un ensemble de gènes maternels différent de celui qui détermine l'axe antéro-postérieur. Le mécanisme de base est très similaire à celui décrit dans la Section 2.10 pour les extrémités de l'embryon. Le récepteur impliqué dans l'organisation de l'axe dorso-ventral est une protéine maternelle appelée Toll, distribuée de façon homogène au niveau de la membrane plasmique de l'œuf

Fig. 2.13 Établissement d'un gradient maternel de la protéine Hunchback. A gauche : dans l'œuf non fécondé, l'ARNm hunchback maternel (en turquoise) est présent à un niveau relativement bas dans l'ensemble de l'œuf, alors que l'ARNm nanos (en jaune) est localisé postérieurement. La photographie représente une hybridation in situ montrant l'emplacement de l'ARNm nanos (en noir). A droite : après la fécondation, l'ARNm nanos est traduit et la protéine Nanos bloque la traduction de l'ARNm hunchback dans les régions postérieures, donnant lieu à un gradient antéro-postérieur limité de la protéine Hunchback maternelle. La photographie montre la distribution graduée de Nanos, détectée avec un anticorps marqué.

Photographies aimablement communiquées par R. Lehmann, d'après Griffiths, et al. : An Introduction to Genetic Analysis, 6^e édition. New York : W.H. Freeman & Co., 1996.



Fig. 2.14 La protéine réceptrice Torso est impliquée dans la spécification des

régions terminales de l'embryon. La protéine réceptrice codée par le gène *torso* est présente dans toute la membrane plasmique de l'œuf. Son ligand est déposé dans la membrane vitelline à chaque extrémité de l'œuf pendant l'ovogenèse. Après la fécondation, le ligand est libéré et diffuse à travers l'espace périvitellin pour activer la protéine Torso uniquement aux extrémités de l'embryon. fécondée. L'extrémité ventrale de l'axe est déterminée par la production localisée dans l'espace périvitellin ventral du ligand pour ce récepteur. Le ligand est un fragment protéique, produit par clivage protéolytique d'une protéine maternelle appelée Spätzle. Après la fécondation, Spätzle est distribuée uniformément dans tout l'espace périvitellin. Le clivage protéolytique localisé de Spätzle est contrôlé par un petit ensemble de gènes maternels qui sont exprimés uniquement dans un groupe de cellules folliculaires de la future région ventrale, représentant le tiers de la surface totale de l'œuf en développement. Ces cellules sécrètent dans l'enveloppe vitelline une enzyme très importante, une héparane sulfate sulfotransférase, codée par le gène *pipe*. Pipe permet de restreindre l'activité protéolytique au niveau de l'enveloppe vitelline située sur la face ventrale de l'embryon, pour une raison encore non totalement élucidée. Le clivage protéolytique de Spätzle ne se produit donc que dans l'espace périvitellin ventral.

L'ARNM *Toll* est transcrit dans l'ovocyte et n'est probablement pas traduit avant la fécondation. Bien que la protéine Toll soit présente au niveau de toute la membrane de l'œuf fécondé, elle est activée uniquement dans la future région ventrale de l'embryon, du fait de la production localisée de son ligand, Spätzle. L'activation de Toll est forte dans la région où la concentration de son ligand est la plus élevée, et décroît rapidement en bordure de cette zone probablement parce que l'essentiel du ligand, peu abondant, est rapidement capté par les récepteurs Toll. L'activation de Toll envoie un signal vers le cytoplasme adjacent de l'embryon. À ce stade, l'embryon est encore un blastoderme syncytial et ce signal provoque l'entrée dans les noyaux voisins de la protéine maternelle Dorsal, (Fig. 2.15), un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans l'organisation de l'axe dorso-ventral.

2.12 Dorsal génère une information de position le long de l'axe dorso-ventral

L'organisation initiale dorso-ventrale de l'embryon est établie perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur à peu près en même temps que cet axe est divisé en régions, terminales, antérieure et postérieure. L'embryon se divise d'abord en quatre régions le long de l'axe dorso-ventral (Section 2.5 et Fig. 2,7) et cette formation est contrôlée par la distribution de la protéine maternelle Dorsal.

Contrairement à Bicoïd, la protéine Dorsal est uniformément répartie dans l'œuf. Dans un premier temps, sa distribution est limitée au cytoplasme, mais sous l'influence des signaux ventraux induits par Toll, Dorsal pénètre dans les noyaux selon



Fig. 2.15 L'activation de la protéine Toll conduit à un gradient intranucléaire de la protéine Dorsal le long de l'axe dorsoventral. Avant que la protéine Toll ne soit activée, la protéine Dorsal (en rouge) est répartie dans toute la bande périphérique du cytoplasme. La protéine Toll est un récepteur qui n'est activé que dans la région ventrale, par un ligand dérivé de la mère (le fragment Spätzle), qui est produit dans l'espace périvitellin après la fécondation. L'activation localisée de Toll entraîne l'entrée de la protéine Dorsal dans les noyaux voisins. La concentration intranucléaire de la protéine Dorsal est plus grande dans les novaux ventraux, ce qui génère un gradient ventrodorsal. D, dorsal ; V, ventral.

une gradation. Sa concentration est plus élevée dans les noyaux ventraux et diminue progressivement dans la direction du dos, au fur et à mesure que le signal de Toll devient plus faible (Fig. 2.15). Ainsi, il y a peu ou pas de Dorsal dans les noyaux des régions dorsales de l'embryon.

Le rôle de Toll a été initialement déduit de l'observation d'une forte « **dorsalisation** », autrement dit de l'absence de structures ventrales dans les embryons mutants dépourvus de cette protéine. Chez ces embryons, la protéine Dorsal ne pénètre pas dans les noyaux et reste uniformément distribuée dans le cytoplasme.

Le transfert de cytoplasme de type sauvage dans des embryons mutants pour *Toll* conduit à la formation d'un nouvel axe dorso-ventral, la région ventrale correspondant toujours au site d'injection. En effet, en l'absence de Toll pour les lier, les fragments de Spätzle produits ventralement diffusent dans tout l'espace périvitellin. Lorsque le cytoplasme de type sauvage est injecté, les protéines Toll qu'il contient pénètrent dans la membrane au niveau du site de l'injection. Les fragments Qui produit la région ventrale au niveau du site d'injection.

En l'absence d'un signal provenant de la protéine Toll, la protéine Dorsal ne peut entrer dans les noyaux étant liée dans le cytoplasme à un produit d'un autre gène maternel, la protéine Cactus. Suite à l'activation de Toll, Cactus est dégradée et ne se lie plus à Dorsal, qui est alors libre d'entrer dans les noyaux. La voie menant de Toll à l'activation de Dorsal est présentée dans l'Encart 2B. Dans les embryons dépourvus de protéines Cactus, la quasi-totalité des protéines Dorsal se trouvent dans les noyaux, le gradient de concentration de Dorsal est peu marqué et les embryons sont « **ventralisés** », autrement dit aucune structure dorsale ne se développe.

RÉSUMÉ

Les gènes maternels en agissant dans l'ovaire de la mouche femelle établissent une hétérogénéité de l'œuf par des dépôts localisés d'ARNm et de protéines. Après la fécondation, les ARNm maternels sont traduits et fournissent aux noyaux embryonnaires des informations de position sous la forme de gradients de protéines ou de protéines concentrées localement. L'axe antéro-postérieur est caractérisé par un gradient décroissant d'avant en arrière de la protéine maternelle Bicoïd qui contrôle la formation de la région antérieure. Pour un développement normal, il est essentiel que la protéine maternelle Hunchback soit absente de la région postérieure et sa traduction est contrôlée par un gradient postéro-antérieur de Nanos. Les extrémités de l'embryon sont définies par l'activation localisée du récepteur membranaire Torso aux deux pôles de l'embryon. L'axe dorso-ventral est établi par un gradient (de ventral à dorsal) de localisation nucléaire de la protéine Dorsal, suite à l'activation ventrale du récepteur Toll par un fragment de la protéine Spätzle.



ENCART 2B La voie de signalisation Toll : une voie multifonctionelle

L'interaction entre les protéines Dorsal et Cactus dans la voie de signalisation Toll de la drosophile n'est pas un cas isolé : la protéine Dorsal est un facteur de transcription ayant une homologie avec la famille de facteurs de transcription Rel/NF kB des vertébrés, qui sont impliqués dans la régulation de l'expression génique dans les réponses immunitaires. La voie de signalisation Toll est également utilisée chez la mouche adulte dans un contexte fonctionnel anti-infectieux. La découverte de ces voies de défense immunitaire innée chez la mouche et la reconnaissance de l'importance des récepteurs Toll-like et de la voie NFxB dans l'immunité humaine, ont été récompensées par l'attribution du prix Nobel de physiologie et de médecine en 2011 à un chercheur français Jules Hoffmann travaillant sur l'immunité innée chez la drosophile et à deux autres chercheurs, Bruce Beutler et Ralph Steinman, s'intéressant à l'immunité innée humaine. Donc, ce mécanisme permettant de réguler l'entrée d'un facteur de transcription dans le noyau, qui peut sembler assez spécialisé, est probablement largement utilisé pour contrôler l'expression des gènes et la différenciation cellulaire.

La voie de signalisation Toll est donc un bon exemple d'une voie de signalisation intracellulaire conservée, utilisée par les animaux, dans différents contextes, allant par exemple du développement de l'embryon à la défense contre les infections dans le cas de la drosophile. Tous les membres de la famille Rel/NFxB sont généralement maintenus inactifs dans le cytoplasme jusqu'à ce que la cellule soit stimulée par un récepteur approprié. Cela conduit à une dégradation de la protéine inhibitrice, ce qui libère le facteur de transcription. Ce dernier pénètre ensuite dans le noyau et active la transcription génique (Figure 1). Dans la voie Toll de l'embryon de drosophile, Dorsal est maintenue inactive dans le cytoplasme du syncytium par la protéine Cactus. Lorsque Toll est activée par interaction avec le fragment de Spätzle, son domaine cytoplasmique se lie à une protéine adaptatrice dMyD88 (ou Tube), qui à son tour interagit avec et active la protéine kinase Pelle. L'activation de



Pelle conduit, suite à plusieurs étapes supplémentaires pas bien caractérisées, à la phosphorylation et à la dégradation de Cactus. Cela libère Dorsal, qui est alors libre d'entrer dans le noyau.

Chez la drosophile adulte, le récepteur Toll est stimulé par les infections mycosiques (dues à des champignons) et bactériennes et sa voie de signalisation est impliquée dans la production de peptides antimicrobiens. Dans l'espèce humaine, les récepteurs Toll-like qui agissent essentiellement par la même voie, sont également impliqués dans la réponse innée aux infections microbiennes. IRAK et IkB sont, chez les mammifères, les homologues, respectivement, de Pelle et Cactus, et jouent les mêmes rôles dans cette voie. Chez les vertébrés, NFkB est également activé en réponse à la signalisation par des récepteurs autres que Toll.

Localisation des déterminants maternels pendant l'ovogenèse

Après avoir vu comment les localisations particulières des produits de gènes maternels dans l'œuf fécondé contrôlent le développement initial de l'embryon, va être considéré maintenant comment ces produits sont localisés de manière si précise. Lorsque l'œuf de drosophile est libéré de l'ovaire, il a déjà une organisation bien définie. L'ARNm *bicoïd* est localisé à l'extrémité antérieure et les ARNm *nanos* et *oskar* à l'extrémité opposée. La protéine Torso-like est présente dans l'enveloppe vitelline aux deux pôles, et d'autres protéines maternelles sont localisées dans l'enveloppe vitelline ventrale. De nombreux autres ARNm maternels, tels que *caudal, hunchback, Toll, torso, dorsal*, et *cactus*, sont répartis uniformément dans l'œuf. Comment ces ARNm et protéines maternels sont-ils déposés dans l'œuf pendant l'**ovogenèse** et comment sont-ils localisés chacun au bon endroit ?

Le développement de l'ovocyte dans l'ovaire chez la drosophile est représenté dans la Fig. 2.16. Une cellule souche germinale diploïde dans le **germarium** se divise de façon asymétrique pour produire une autre cellule souche et une cellule appelée cystoblaste, qui subit quatre autres divisions mitotiques pour donner 16 cellules





développement des ovocytes à partir de cellules souches commence dans un germarium à l'extrémité de l'ovariole. Une cellule souche se divisera quatre fois pour donner 16 cellules établissant entre elles des connexions cytoplasmiques et formant une structure appelée un cyste. Une des cellules deviendra l'ovocyte, les autres deviendront les cellules nourricières. Les cellules nourricières et l'ovocyte s'entourent de cellules folliculaires et la structure résultante se détache du germarium, formant un follicule ou chambre ovarienne Les chambres ovariennes produites successivement sont toujours attachées les unes aux autres au niveau des pôles, formant ainsi une chaîne. L'ovocyte croît pendant que les cellules nourricières lui fournissent du matériel grâce à des ponts cytoplasmiques. La chaîne de chambres ovariennes a une polarité intrinsèque, qui se reflète dans celle de l'ovocyte, lequel présente son extrémité antérieure au contact des cellules nourricières, du côté du germarium. Les cellules folliculaires ont un rôle clé dans la mise en place de l'organisation de l'ovocyte.

conservant des ponts cytoplasmiques entre elles. On nomme ce groupe de cellules le **cyste germinal**. L'une de ces 16 cellules deviendra l'ovocyte, les 15 autres deviendront les **cellules nourricières** produisant de grandes quantités de protéines et d'ARN exportés dans l'ovocyte par les ponts cytoplasmiques. Les cellules ovariennes somatiques forment une gaine de **cellules folliculaires** autour des cellules nourricières et l'ovocyte, l'ensemble formant un follicule ou **chambre ovarienne**. Les chambres ovariennes produites successivement sont reliées les unes aux autres par des « tiges » dérivées des cellules folliculaires. La chaîne de chambres ovariennes dans l'**ovariole** a une polarité particulière, qui se traduit en une polarité ovocytaire *via* la signalisation entre l'ovocyte et les cellules folliculaires environnantes. Dans le schéma de la Fig. 2.16, la future extrémité antérieure de chaque follicule se trouve à gauche.

Les cellules folliculaires ont un rôle clé dans l'organisation des axes de l'ovocyte. Elles forment des sous-populations fonctionnelles en fonction de leur position dans la chambre à œuf et expriment des gènes spécifiques qui ont des effets différents sur les parties de l'ovocyte qui leur sont adjacentes. Les cellules folliculaires sécrètent également les constituants de l'enveloppe vitelline et du chorion qui entourent l'ovocyte mature. Finalement, l'ovocyte finit par occuper la totalité de la chambre ovarienne, la tige disparaît, et l'ovule est libéré de l'ovaire. Pendant la plupart des stades de l'ovogenèse discutés ici, l'ovocyte est arrêté en prophase de première division de méiose (Fig. 10.8). La méiose s'achève après la fécondation.

2.13 L'axe antéro-postérieur de l'œuf de drosophile est déterminé par des signaux provenant de la chambre ovarienne et par des interactions entre l'ovocyte et les cellules folliculaires

L'axe antéro-postérieur est le premier axe à être établi dans l'ovocyte. Il résulte initialement du mouvement de l'ovocyte d'une position centrale où il est entouré de cellules nourricières, vers l'extrémité postérieure de la chambre ovarienne, où il rentre en contact avec les cellules folliculaires. Ce réarrangement se produit alors que la chambre ovarienne commence à se séparer du germarium, et s'explique par l'adhérence préférentielle de la future extrémité postérieure de l'ovocyte aux cellules folliculaires postérieures adjacentes. La polarité antéro-postérieure de l'ovocyte est le résultat d'une signalisation entre la partie antérieure de la chambre ovarienne la plus âgée et la partie postérieure de la plus jeune (Fig. 2.17).

Le cyste germinal communique avec les cellules folliculaires antérieures *via* une voie de signalisation très utilisée dans le développement animal, la voie Delta-Notch décrite en détail plus loin (Encart 5D). Les cellules de la lignée germinale produisent le ligand Delta, qui interagit avec le récepteur Notch des cellules folliculaires. Cette interaction induit la formation de cellules folliculaires antérieures qui deviennent des



Fig. 2.17 Les signaux provenant de chambres ovariennes plus âgées ou plus jeunes polarisent initialement l'ovocyte de drosophile. Au moment où un cyste germinal bourgeonne à partir du germarium, la voie Delta-Notch (petites flèches rouges) est activée et induit la formation de cellules polaires antérieures (en rouge). Celles-ci communiquent à leur tour avec les cellules antérieures qui leur sont adjacentes et les incitent à former une tige (en vert). Les signaux provenant de la tige induisent les cellules folliculaires adjacentes dans le cyste plus jeune à devenir des cellules polaires postérieures (en rouge). Ces signaux induisent le cyste plus jeune à s'arrondir et l'ovocyte à se positionner à la partie postérieure de la chambre à œuf. Les signaux provenant des cellules polaires antérieures et postérieures spécifient alors les cellules folliculaires adjacentes comme des cellules folliculaires postérieures et antérieures (plus de détails dans la Fig. 2.18). Les flèches jaunes indiquent la direction générale de la signalisation des chambres ovariennes plus anciennes ou plus jeunes.

cellules folliculaires polaires spécialisées. Ces dernières sécrètent alors une molécule appelée Unpaired, qui se lie à des récepteurs de cellules folliculaires adjacentes, et stimulent de cette façon la voie de signalisation JAK-STAT (Encart 2C) conduisant les cellules folliculaires à former une tige entre deux chambres d'œufs voisines. Les signaux responsables de la formation de la tige et de la spécification antérieure et postérieure des cellules folliculaires sont détaillés dans la Fig. 2.18. Les cellules de la tige stimulent la production de la Cadhérine, une molécule d'adhérence. Des interactions adhésives entre l'ovocyte du jeune cyste et les cellules de la tige immédiatement adjacente maintiennent l'ovocyte à l'extrémité postérieure de la chambre ovarienne. (La façon dont les cadhérines et d'autres molécules d'adhérence agissent est expliquée dans l'Encart 9A). Ce faisant, une polarité antéro-postérieure se propage d'une chambre ovarienne à la suivante.

La localisation postérieure de l'ovocyte est accompagnée par un mouvement des ARNm maternels de la future extrémité antérieure de l'ovocyte, où ils ont été déposés par les cellules nourricières, à sa future extrémité postérieure (Fig. 2.18). Ce mouvement dépend d'une réorientation des microtubules de l'ovocyte, sur lesquelles les ARNm maternels sont transportés. À ce stade de l'ovogenèse, le noyau est également

Fig. 2.18 Formation de la tige et spécification des cellules folliculaires antérieures et

postérieures. De haut en bas, premier schéma : dans la chambre ovarienne la plus âgée, Delta (flèches rouges) agit depuis les cellules de la lignée germinale pour spécifier les cellules polaires antérieures (en rouge). Deuxième schéma : ces dernières produisent la molécule de signalisation Unpaired qui transforme les cellules adjacentes en cellules de la tige (en vert). Les interactions d'adhérence ancrent l'ovocyte à l'arrière de la chambre ovarienne la plus jeune et les ARNm maternels se déplacent vers l'arrière de l'ovocyte. Troisième schéma : les cellules folliculaires les plus postérieures du cyste le plus jeune sont spécifiées comme cellules polaires et sécrètent Unpaired. Les ARNm codant la protéine Gurken dans l'ovocyte (voir texte) sont traduits et Gurken agit sur les cellules folliculaires adjacentes. Un deuxième cycle de signalisation Delta à partir de la lignée germinale initie la différenciation des cellules folliculaires. Celles qui sont exposées à la fois à Unpaired et à Gurken se différencient en cellules folliculaires postérieures. Celles exposées à Unpaired en l'absence de Gurken se différencient en cellules folliculaires antérieures.

D'après la figure 4 de Roth, S. et Lynch, J. A : **Symmetry breaking during Drosophila oogenesis**. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009, 1 : a001891.



ENCART 2C La voie de signalisation JAK-STAT

Cette voie de signalisation relativement simple a été identifiée chez les mammifères lors de la réponse cellulaire à des cytokines, tels les interférons et d'autres cytokines cruciales pour le développement et la fonction du système immunitaire.

Chez la drosophile, cette voie intervient dans une grande variété de fonctions, comme la segmentation de l'embryon, la croissance et la formation des disques imaginaux, l'ovogenèse (Section 2.13), et les réponses antimicrobiennes chez la mouche adulte. L'élément central de la voie JAK-STAT est une tyrosine kinase cytoplasmique de la famille Janus kinase (JAK). Cette famille tient son nom du mythique dieu romain à deux têtes Janus, car les JAK ont deux domaines à activité kinase. Les JAK sont associées à la partie cytoplasmique des récepteurs de cytokines, et agissent comme intermédiaires entre les récepteurs et les effecteurs transcriptionnels de la voie, les protéines STAT (pour Signal Transducers and Activators of Transcription) (Figure 1). La drosophile a un seul récepteur pour la voie JAK-STAT appelé Domeless (Dome), une seule protéine JAK appelée Hopscotch, et une seule protéine STAT. Les ligands de Dome sont les protéines Unpaired. Les mammifères ont de multiples récepteurs et ligands de type STAT/JAK. Comme les récepteurs de cytokines de mammifères, Dome se compose de deux chaînes de protéines transmembranaires, chacune étant associée à une protéine Hopscotch. Quand Unpaired se lie à Dome, les protéines JAK sont activées par autophosphorylation et phosphorylent aussi la queue cytoplasmique du récepteur au niveau de résidus tyrosine particuliers. Cela génère des sites de liaison pour les protéines STAT, qui en l'absence de liaison du ligand semblent faire la navette entre le cytosol et le



noyau. Les STAT phosphorylées se dimérisent et migrent vers le noyau où ils contrôlent la transcription de nombreux gènes cibles. Chez la drosophile, la voie présente une rétroaction négative : les protéines SOCS codées par un gène cible des STAT, interfèrent avec l'activation de Hopscotch et STAT.

positionné à l'extrémité postérieure de l'ovocyte. La réorientation des microtubules ovocytaires dépend de protéines appelées protéines PAR, pour « PARtition défectueuse ». Les protéines PAR sont notamment impliquées dans la détermination de la polarité antéro-postérieure des cellules dans des situations diverses au cours du développement animal. Elles ont été découvertes chez *Caenorhabditis elegans*, où elles jouent un rôle dans le contrôle de la première division asymétrique de l'œuf fécondé, et sont décrites plus en détail dans le Chapitre 6

Une fois que l'ovocyte occupe une position postérieure dans le follicule, les étapes suivantes de sa polarisation antéro-postérieure se font par l'intermédiaire d'une protéine appelée Gurken, qui est un membre de la famille des facteurs de croissance TGF- α (pour *Transforming Growth Factor-\alpha*). Les principales familles de facteurs de croissance de la drosophile sont répertoriées dans la Figure 2.19, et se retrouvent chez les vertébrés et d'autres espèces. À ce stade du développement de l'ovocyte, l'ARNm *gurken* maternel est situé postérieurement.

Les cellules à l'extrémité la plus antérieure de la tige deviennent elles aussi des cellules polaires et sécrètent le ligand Unpaired, qui conduit environ 200 cellules folliculaires adjacentes à l'extrémité postérieure de la chambre ovarienne la plus récente à devenir les « cellules terminales » (Fig. 2.18). Dans le même temps, l'ARNm *gurken* est traduit à l'extrémité postérieure de l'ovocyte à proximité du noyau. On obtient ainsi une concentration locale postérieure de la protéine Gurken, qui est transportée vers la membrane de l'ovocyte. Gurken transforme les cellules folliculaires terminales adjacentes en cellules folliculaires postérieures en stimulant localement le récepteur protéique Torpedo, présent à la surface des cellules folliculaires. Torpedo est

Molécules de signalisation utilisées couramment chez la Drosophile			
Voie de signalisation et protéines de signalisation (ligands)	Récepteurs	Effecteurs nucléaires	Exemples de rôles dans le développement de la drosophile
Hedgehog (voir Encart 2F)			
Hedgehog	Patched	Cubitus interruptus (Cu)	Organisation des segments chez les insectes (ce chapitre), information de position dans les disques imaginaux
Wingless (Wnt) (voir encart 4B)			
Wingless et 5 autres protéines Wnt	Frizzled	complexe β-caténine/TCF	Organisation des segments (ce chapitre) et des disques imaginaux (chapitre 11), développement des systèmes nerveux et musculaires
Delta/Notch (voir Encart 5D)			
Delta, Serrate	Notch	Nintra (domaine intracellulaire de Notch clivé)/Supressor of hairless (Su(H))	Inhibition latérale lors du développement des systèmes nerveux (chapitre 12) et musculaire, nombreux rôles dans la formation des tissus et la spécification cellulaire
Facteur de croissance transformant (TGF-α)/ récepteur du facteur de croissance épidermique			
Gurken, Spitz, Vein	Torpedo (récepteur EGF)	Pointed	Polarisation de l'ovocyte (ce chapitre), développement de l'œil, différenciation des nervures des ailes
BMP et facteur de croissance transformant (TGF-β) (Encart 4C)			
Decapentaplegic, screw, glass bottom boat (homologues BMP)	Sous-unités de type I (ex. Thickvein) et type II (e.x. Punt) formant des récepteurs hétérodimériques sérine-thréonine kinase	SMADs (Mad, Medea)	Organisation de l'axe dorso-ventral (ce chapitre), organisation de l'axe antéro-postérieur et croissance des disques imaginaux (chapitre 11)
Facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Encart 4E)			
Branchless, Pyramus, Thisbe	Breathless, Heartless	Fonction transcriptionnelle non démontrée	Migration des cellules de la trachée (chapitre 11) et du mésoderme
JAK-STAT (Encart 2C)			
Unpaired	Domeless (se lie à la sérine-thréonine kinase Hopscotch)	STAT	Polarisation de l'ovocyte (ce chapitre), segmentation, formation des disques imaginaux

Fig. 2.19 Signaux intercellulaires

communs chez la drosophile. Ces voies de signalisation sont universellement utilisées par tous les animaux et ont été déterminées en grande partie grâce à des criblages génétiques chez la drosophile.

un récepteur à activité tyrosine kinase et est l'homologue chez la drosophile de EGFR (pour *Epidermal Growth Factor Receptor*) des mammifères. Ce récepteur fonctionne comme le récepteur au FGF (Encart 4E). En réponse au signal Gurken, les cellules folliculaires postérieures produisent un signal non encore identifié qui induit une réorientation des microtubules de l'ovocyte, de sorte qu'à mi-ovogenèse, les extrémités « moins » de la plupart des microtubules sont dirigées vers la partie antérieure, et les extrémités « plus » vers la partie postérieure de l'ovocyte.

2.14 La localisation des ARNm maternels aux extrémités de l'ovocyte dépend de la réorganisation de son cytosquelette

La réorientation des microtubules est essentielle pour la localisation finale des ARNm maternels, comme *bicoïd* et *oskar* à chaque extrémité de l'œuf. Les ARNm *bicoïd* sont initialement produits par les cellules nourricières situées du côté antérieur de l'ovocyte. Ils sont ensuite transférés dans l'ovocyte qui va les accumuler dans sa partie postérieure suite à la réorganisation des microtubules qui accompagne le positionnement postérieur de l'œuf. Après une deuxième réorganisation des microtubules (décrite dans la section 2.13), les ARNm *bicoïd* sont transportés le long des microtubules réorientés, grâce à une protéine motrice, la Dynéine, jusqu'à leur emplacement final, la partie la plus antérieure de l'ovocyte (Fig. 2.20, à gauche). Les ARNm *oskar* sont transférés des cellules nourricières vers l'ovocyte où ils sont transportés vers son extrémité postérieure par une autre protéine motrice, la Kinésine, qui sert de « cargo » le long des microtubules dans la direction opposée à la Dynéine (Fig. 2.20, à droite). Ces deux localisations nécessitent la protéine de liaison à l'ARN, Staufen, qui peut elle-même être utilisée pour définir les extrémités antérieures et postérieures de l'ovocyte (Fig. 2.21).



Fig. 2.20 Les ARNm bicoïd et oskar sont localisés aux extrémités, respectivement, antérieure et postérieure de l'ovocyte. La localisation des ARNm maternels délivrés à l'ovocyte par les cellules nourricières est réalisée par transport le long des microtubules. La protéine motrice Dynéine transporte l'ARNm bicoïd (en rouge) vers les extrémités (-) des microtubules. L'ARNm oskar (en vert) est transporté vers les extrémités (+) des microtubules par la protéine motrice Kinésine.

Illustration d'après St Johnston, D. : **Moving messages : the intracellular localization of mRNAs**. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005, **6 :** 363-375.



Fig. 2.21 La protéine de liaison à l'ARN, Staufen, est localisée à chaque pôle de l'ovocyte de drosophile. La localisation de la protéine Staufen à différents stades du développement des ovocytes, est rendue visible en liant le gène codant cette protéine à la région codante de la GFP et en établissant des mouches transgéniques pour cette construction. a, Dans une chambre ovarienne de stade 6, Staufen (en vert) s'accumule dans l'ovocyte. Les chambres ovariennes fixées ont été colorées avec de la phalloidine-rhodamine qui marque les filaments d'actine (en rouge). b, Dans une chambre à œuf de stade 9,

Staufen est localisée dans la partie postérieure de l'ovocyte. c, Dans une chambre à œuf de stade 10b, Staufen est localisée à la fois aux pôles antérieur et postérieur de l'ovocyte.

D'après Martin, S.G., et al. : **The identification of novel genes** required for Drosophila anteroposterior axis formation in a germline clone screen using GFP-Staufen. Development. 2003, **130** : 4201-4215.

Des particules contenant les ARNm *oskar* se déplacent dans toutes les directions, avec une préférence pour l'extrémité postérieure, ce qui est suffisant pour en envoyer la plus grande partie à cet endroit. Un des rôles de l'ARNm *oskar* et de son produit est de concentrer le plasme germinal à l'extrémité postérieure de l'ovocyte. Dans l'embryon, ce plasme est incorporé dans les cellules polaires (Section 2.1) et fait de ces dernières les cellules germinales primordiales.

La localisation postérieure des ARNm *oskar* entraîne la production de la protéine Oskar postérieurement, ce qui permettra la localisation ultérieure des ARNm *nanos* à cet endroit (Section 2.9), car les ARNm *nanos* sont recrutés là où la protéine Oskar est synthétisée.

La protéine Torso-like, qui caractérise les extrémités de l'embryon de drosophile, est synthétisée et sécrétée exclusivement par les cellules folliculaires situées au niveau des pôles postérieur et antérieur. La protéine Torso-like est ainsi déposée exclusivement dans l'enveloppe vitelline aux deux extrémités de l'ovocyte pendant l'ovogenèse. Après la fécondation, elle agit de concert avec d'autres protéines pour provoquer la transformation de Trunk et la production du ligand de Torso (Section 2.10).

2.15 L'axe dorso-ventral de l'œuf est spécifié par un déplacement du noyau ovocytaire suivi par des signalisations entre l'ovocyte et les cellules folliculaires

La mise en place de l'axe dorso-ventral de l'œuf implique une nouvelle série d'interactions entre ovocyte et cellules folliculaires, qui se produisent une fois que l'extrémité postérieure de l'ovocyte est spécifiée. En réponse à un signal provenant des cellules folliculaires postérieures, le noyau de l'ovocyte quitte la partie postérieure de l'ovocyte pour rejoindre son bord antérieur (Fig. 2.22). Ce mouvement résulte d'une force de poussée générée par la croissance des microtubules astraux qui ancrent les structures cellulaires appelées centrosomes au cortex cellulaire. La protéine Gurken est traduite depuis ce nouveau site à partir d'ARNm transportés sur les microtubules depuis leur emplacement postérieur précédent.

La protéine Gurken produite localement agit comme un signal adressé aux cellules folliculaires adjacentes, les spécifiant en cellules folliculaires dorsales, le côté éloigné du noyau devenant ainsi par défaut la région ventrale. La Figure 2.23 indique ce qui caractérise la partie dorsale en matière d'expressions géniques spécifiques. Les cellules folliculaires ventrales produisent des protéines, telle Pipe (Section 2.11), qui sont déposées dans l'enveloppe vitelline ventrale de l'ovocyte et jouent un rôle déterminant dans l'établissement de la face ventrale de l'embryon.



Fig. 2.22 L'axe dorso-ventral de la chambre ovarienne et de l'ovocyte est spécifié par des interactions supplémentaires entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. La signalisation à partir des cellules folliculaires postérieures nouvellement spécifiées résulte en un déplacement du noyau de l'ovocyte vers la bordure antérieure de l'ovocyte. Les ARNm *gurken* provenant des cellules nourricières sont transportés sur les microtubules vers la région entourant le noyau. Les ARNm *gurken* sont traduits et la sécrétion locale de la protéine Gurken depuis l'ovocyte spécifie les cellules folliculaires adjacentes comme cellules folliculaires dorsales et ce côté de l'ovocyte comme futur côté dorsal. La photo montre les ARNm *gurken* à leur nouvel emplacement.

Photographie aimablement communiquée par le Dr D. St. Johnston, Wellcome Images.

Illustration d'après González-Reyes, A., Elliott, H., St Johnston, D.: Polarization of both major body axes in Drosophila by gurkentorpedo signalling. Nature 1995, **375**: 654-658.



Fig. 2.23 Développement des ovocytes de la drosophile. Observation d'un ovocyte de drosophile associé à ses 15 cellules nourricières et entouré par une monocouche de 700 cellules folliculaires. L'ovocyte et les cellules folliculaires coopèrent pour définir le futur axe dorso-ventral de l'œuf et de l'embryon. À noter à cet égard l'expression d'un gène uniquement dans les cellules folliculaires recouvrant la région dorsale antérieure de l'ovocyte (coloration bleue).

Photographie aimablement communiquée par A. Spradling.

RÉSUMÉ

Les ovocytes de la drosophile se développent à l'intérieur de chambres individuelles. Celles-ci sont produites au fur et à mesure à partir d'un germarium qui contient des cellules souches germinales produisant les ovocytes et des cellules souches somatiques qui donnent naissance aux cellules folliculaires entourant l'ovocyte. Les cellules nourricières fournissent à l'ovocyte de grandes quantités d'ARNm et de protéines dont certains d'entre eux se localisent à des endroits particuliers de l'ovocyte. Les signaux émis par une chambre ovarienne âgée, conduisent l'ovocyte, d'une chambre ovarienne adjacente plus jeune, à se localiser postérieurement dans sa chambre en raison de l'adhérence cellulaire différentielle des cellules folliculaires postérieures. L'ovocyte envoie ensuite un signal à ces cellules folliculaires qui répondent par un signal provoquant en retour une réorganisation du cytosquelette ovocytaire. Cette réorganisation permet la concentration des ARNm *bicoïd* à l'extrémité antérieure et d'autres ARNm à l'extrémité postérieure de l'ovocyte, créant ainsi les prémices de l'axe antéro-postérieur embryon-naire. L'axe dorso-ventral de l'ovocyte est également induit par un signal local de l'ovocyte qui permet de spécifier des cellules folliculaires dorsales. Les cellules folliculaires du côté opposé de l'ovocyte spécifient la face ventrale de celui-ci par le dépôt de protéines maternelles dans l'enveloppe vitelline ventrale. Les cellules folliculaires à chaque extrémité de l'ovocyte spécifient de manière similaire les extrémités de celui-ci par un dépôt localisé de protéines maternelles dans l'enveloppe vitelline.



Mise en place de l'organisation de l'embryon précoce

Il a été vu comment les gradients des protéines Bicoïd, Hunchback et Caudal sont établis le long de l'axe antéro-postérieur et comment la protéine Dorsal forme un gradient intranucléaire selon l'axe ventro-dorsal. L'ensemble de ces informations de position d'origine maternelle marque le début d'une cascade de transcription des gènes zygotiques, dont bon nombre codent eux-mêmes pour des facteurs de transcription, de façon à donner une identité à chaque région de l'embryon. Dans cette partie du chapitre, sera envisagée la façon dont l'embryon se construit le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Les deux axes de l'embryon se mettent en place simultanément, mais en utilisant différents ensembles de facteurs de transcription et protéines de signalisation. L'établissement de l'axe dorso-ventral sera d'abord examiné, celui-ci impliquant les spécifications du mésoderme et de l'ectoderme, ainsi que la subdivision de l'ectoderme qui permet la formation du neuroectoderme à l'origine du système nerveux central.

2.16 L'expression des gènes zygotiques selon l'axe dorso-ventral est contrôlée par la protéine Dorsal

La protéine Dorsal entrant dans les noyaux du blastoderme syncytial forme un gradient de concentration intranucléaire ventro-dorsal (Section 2.12). Ce gradient dure environ deux heures, au cours desquelles le blastoderme devient cellulaire. Dorsal est un facteur de transcription et son gradient subdivise l'axe dorso-ventral en au moins quatre régions définies par l'expression de gènes cibles répondant à différentes concentrations de Dorsal (Fig. 2.24). C'est aussi le moment où les feuillets embryonnaires commencent à se former et Dorsal agit pour définir leurs limites. Du ventre au dos, les principales régions sont le mésoderme, l'ectoderme ventral puis dorsal, et



Fig. 2.24 Régionalisation de l'axe dorsoventral par les interactions entre Dorsal

et ses gènes cibles. Dans les régions dorsales, où la protéine Dorsal nucléaire est absente, les gènes tolloïd, zerknullt et decapentaplegic, pour lesquels Dorsal agit en tant que répresseur, sont exprimés. Dans la région la plus ventrale, la forte concentration de la protéine Dorsal active l'expression des gènes twist et snail, qui ont des sites de fixation de faible affinité pour Dorsal. Le futur neuroectoderme est caractérisé par l'expression du gène rhomboïd. La protéine Twist permet de maintenir l'expression de *twist* lui-même et de *snail*, tandis que la protéine Snail contribue à former la limite entre le mésoderme et le neuroectoderme en réprimant l'expression de rhomboïd dans la région ventrale. Cette frontière est caractérisée par l'expression du gène singleminded, qui est contrôlée par un site à haute affinité pour la protéine Dorsal et des sites pour d'autres facteurs de transcription.

l'amnioséreuse. Le mésoderme donne naissance à des tissus mous internes tels que les tissus musculaires et conjonctifs ; l'ectoderme ventral devient le neuroectoderme, à l'origine du système nerveux central, mais aussi de l'épiderme ventral ; l'ectoderme dorsal donne naissance au reste de l'épiderme. Le troisième feuillet, l'endoderme, qui ne sera pas évoqué ici, se situe aux deux extrémités de l'embryon, et donnera naissance à l'intestin moyen (Fig. 2.3).

La mise en place des régions de l'embryon le long des axes pose un problème qui rappelle l'organisation des motifs du drapeau français (Section 1.15). On estime que l'expression de 50 gènes est directement contrôlée par le gradient de la protéine Dorsal et il est remarquable que ce gradient aboutisse à des patrons d'expression génique si précis et si reproductibles. Il s'agit d'un bon exemple de la manière dont le gradient d'un facteur de transcription peut à lui seul générer des informations de position spécifiques au sein d'un ensemble de noyaux initialement identiques sur le plan fonctionnel. Dorsal est présente en faible quantité dans les noyaux de la moitié dorsale de l'embryon. Dorsal peut agir comme un activateur ou un répresseur de l'expression génique et, à la suite de ses actions, des gènes sont spécifiquement exprimés dans des régions particulières le long de l'axe dorso-ventral.

Le gradient de la protéine Dorsal est un exemple classique de la façon dont un facteur de transcription peut, suivant sa concentration locale, réguler différemment l'expression de gènes distincts, et ainsi attribuer aux cellules dans lesquelles il agit différentes identités au cours du développement. L'action locale de Dorsal dépend de son affinité pour ses sites de fixation présents dans les régions régulatrices de ses gènes cibles et varie aussi suivant que la protéine, qui interagit avec des cofacteurs spécifiques, active ou inhibe l'expression des gènes cibles. En outre, d'autres facteurs de transcription fonctionnent de concert avec Dorsal pour réguler l'expression des gènes cibles.

La région la plus ventrale (une bande d'une largeur correspondant à 12-14 cellules) est caractérisée par ses plus fortes concentrations intranucléaires en Dorsal. Des gènes qui ne contiennent que des sites de fixation à faible affinité pour Dorsal, ne seront exprimés que dans cette région, en raison des fortes concentrations locales de Dorsal. L'expression de *snail* et *twist*, qui codent des facteurs de transcription, caractérise cette région (Fig. 2.24). Les gènes exprimés dans la région ventrale ont des sites de fixation pour Twist qui renforce et maintient leur expression.

Le neuroectoderme est induit par des niveaux moyens de Dorsal qui reconnaît des gènes cibles portant des sites de liaison à haute affinité. Dorsal interagit avec d'autres facteurs de transcription qui favorisent sa liaison à l'ADN. Une frontière de l'épaisseur d'une seule cellule entre le mésoderme et le neuroectoderme est caractérisée par l'expression de single-minded, dont l'expression est contrôlée par un site à haute affinité pour Dorsal, et conjointement, par des sites reconnaissant d'autres facteurs de transcription. Cette région correspond au futur mésectoderme, qui donnera naissance à des cellules gliales spécialisées du système nerveux. Le neuroectoderme est défini par l'expression du gène rhomboid, qui code une protéine membranaire impliquée dans la voie de signalisation du récepteur à l'EGF. Leur expression étant activée par Dorsal, single-minded et rhomboid pourraient en principe être exprimés dans la région la plus ventrale de l'embryon, mais leur expression y est réprimée par les produits des gènes les plus ventraux induits par Dorsal, comme twist et snail. Par exemple, le gène rhomboid qui contient des régions régulatrices auxquelles se lient Dorsal et Snail, a son expression activée par Dorsal et réprimée par Snail (Fig. 2.25). Ainsi, rhomboid peut être exprimé uniquement dans les régions dépourvues de Snail et contenant suffisamment de Dorsal dans les noyaux, ce qui limite son expression au domaine ventro-latéral produisant le neuroectoderme.

Dans les régions les plus dorsales de l'embryon, il n'y a pratiquement aucune protéine Dorsal dans les noyaux. Les gènes qui ont des sites de fixation de Dorsal qui agit en tant que répresseur, peuvent donc être exprimés dans ces régions (Fig. 2.25). Les gènes clés exprimés ici sont *decapentaplegic*, *tolloïd*, et *zerknüllt*. *zerknüllt* (*zen*) est exprimé dans la région la plus dorsale, et spécifie l'amnioséreuse. *decapentaplegic* (*dpp*) et *tolloïd* sont largement exprimés dans la région dorsale (Fig. 2.24). La protéine Decapentaplegic est une protéine de signalisation sécrétée avec un rôle clé dans la spécification de la partie dorsale de l'axe dorso-ventral de drosophile, et sa fonction est abordée plus en détail dans la Section 2.17. **Fig. 2.25 Sites de fixation dans les gènes cibles de Dorsal.** Dorsal peut agir comme un activateur ou un répresseur de la transcription en fonction de sa concentration et de ses partenaires sur l'ADN. Des niveaux élevés conduisent à l'activation de l'expression de gènes tels que *twist* et *snail*, dont les produits renforcent leur propre expression en se liant aux mêmes régions régulatrices de l'ADN que Dorsal. Twist et Snail agissent également comme des répresseurs de l'expression de gènes tels que *rhomboïd*, ce qui signifie que ces gènes, dont l'expression dépend aussi de Dorsal, sont réprimés là où Twist et Snail sont présentes. Pour certains gènes, tels *decapentaplegic (dpp)* et *zerknüllt (zen)*, Dorsal agit comme un répresseur en interagissant avec des co-répresseurs et en recrutant des répresseurs tels que Groucho. Ces gènes ne peuvent être exprimés qu'en absence de Dorsal, et c'est pourquoi leur expression est limitée à la région la plus dorsale de l'embryon.

Les mutations dans les gènes maternels qui régulent la formation et l'utilisation du gradient de Dorsal peuvent provoquer des dorsalisations ou des ventralisations de l'embryon (Section 2.12). Chez les embryons dorsalisés, la protéine Dorsal est uniformément exclue des noyaux. Cela a un certain nombre d'effets, comme par exemple l'absence de répression du gène *dpp* qui s'exprime alors de façon homogène. En revanche, *twist* et *snail* ne sont pas exprimés dans ces embryons dorsalisés, puisque ces gènes nécessitent Dorsal pour être exprimés. Le résultat inverse est obtenu dans des embryons ventralisés où la protéine Dorsal est présente à forte concentration dans tous les noyaux. Dans ce cas *twist* et *snail* sont exprimés partout et *dpp* n'est pas du tout exprimé (Fig. 2.26).

Un doublement de la concentration de Dorsal suffit pour qu'une cellule embryonnaire non spécifiée devienne mésodermique ou neurectodermique. À des fins de simplicité, l'intérêt a été porté sur la grande distinction entre mésoderme et neuroectoderme, mais dans cette région, il faudrait en réalité prendre en compte différents seuils de concentration de Dorsal qui sont importants pour la différenciation de la future ligne ventrale médiane et du neuroectoderme. Ce dernier est ainsi subdivisé en trois régions situées le long de l'axe dorso-ventral, qui formeront trois colonnes









Fig. 2.26 Changements de l'expression de twist et decapentaplegic dans les embryons ventralisés. À gauche : dans les embryons normaux, l'expression du gène twist est activée au-dessus d'une certaine concentration seuil (ligne verte) de la protéine Dorsal, alors qu'au-dessus d'un seuil inférieur (ligne jaune) l'expression du gène *decapentaplegic* (*dpp*) est réprimée. À droite : dans les embryons ventralisés à cause de mutations de certains gènes maternels, la protéine Dorsal est présente dans tous les noyaux ; twist est exprimé partout, contrairement à *dpp* qui n'est pas exprimé du tout, parce que la concentration de la protéine Dorsal dépasse, dans tous les noyaux, le seuil requis pour le réprimer.

distinctes de neurones de la future chaîne nerveuse ventrale (sujet qui est repris dans le Chapitre 12). Cette subdivision est principalement le résultat de l'expression de trois gènes codant des facteurs de transcription, induite par des seuils de concentration distincts du gradient Dorsal.

Le gradient de la protéine Dorsal agit donc comme un gradient morphogène le long de l'axe dorso-ventral, Dorsal activant à des concentrations différentes des gènes spécifiques générant ainsi un patron d'expression génique dorso-ventral unique. Les séquences régulatrices de ces gènes peuvent être considérées comme des commutateurs du développement, qui lorsqu'ils sont déclenchés par la fixation de facteurs de transcription, vont activer de nouveaux gènes et engager les cellules dans de nouvelles voies de différenciation. Le gradient de la protéine Dorsal est une réponse au problème du drapeau Français. Mais ce n'est pas toute l'histoire ; un autre gradient est aussi impliqué.

2.17 La protéine Decapentaplegic agit comme un morphogène qui modèle la région dorsale de l'embryon

Le gradient de la protéine Dorsal, avec son point culminant dans la région ventrale, spécifie l'organisation initiale de l'activité des gènes zygotiques selon l'axe dorso-ventral. Ce gradient modèle aussi le mésoderme et le neuroectoderme en activant à différents seuils de concentration d'autres gènes cibles, tels que ceux nécessaires à la régionalisation du système nerveux central (Section 2.16). Mais l'organisation de la région dorsale n'est pas simplement spécifiée par les faibles niveaux de Dorsal, elle l'est aussi par un gradient d'activité d'un autre morphogène, la protéine Decapentaplegic (Dpp). Ainsi, c'est la combinaison de faibles niveaux de Dorsal et de l'activité de Dpp qui spécifie pleinement l'ectoderme dorsal et la région la plus dorsale, l'amnioséreuse. Comme il sera vu dans le Chapitre 4, Dpp est un homologue de BMP-4 (pour *Bone Morphogenetic Protein-4*), un facteur de croissance de la famille TGF- β chez les vertébrés qui participe également à la structuration de l'axe dorso-ventral (la voie de signalisation générale de ces protéines est décrite dans l'Encart 4C).

Peu de temps après l'établissement du gradient intranucléaire de Dorsal, l'embryon devient cellulaire et les facteurs de transcription ne peuvent plus diffuser entre les noyaux. Des protéines sécrétées ou transmembranaires et leurs récepteurs correspondants sont maintenant utilisés pour transmettre des signaux entre les cellules. Dpp est une de ces protéines de signalisation sécrétées (Fig. 2.19). Dpp est également impliquée dans de nombreux autres processus de développement tout au long du développement de la drosophile, y compris la structuration des disques imaginaux des ailes (Chapitre 11).

Le gène *dpp* est exprimé dans la région dorsale de l'embryon où la protéine Dorsal est absente des noyaux. La protéine Dpp diffuse ensuite ventralement depuis cette source, formant un gradient d'activité avec un point culminant dans la région dorsale. Les cellules possèdent des récepteurs qui leur permettent d'évaluer avec précision le nombre de molécules Dpp présentes et de répondre en activant la transcription de gènes particuliers, subdivisant ainsi la région dorsale en diverses sous-régions caractérisées par différents patrons d'expression génique.

Le rôle du gradient de Dpp dans la spécification dorsale a été établi grâce à des injections d'ARNm de *dpp* dans des embryons sauvages précoces. Sous l'effet d'une augmentation anormale de la quantité d'ARNm *dpp* et de sa protéine Dpp, les cellules adoptent une identité plus dorsale qu'observée normalement. L'ectoderme ventral devient de l'ectoderme dorsal et, à des concentrations très élevées de l'ARNm *dpp*, tout l'ectoderme se développe en amnioséreuse. Une des cibles les plus importantes de Dpp est le gène *zen*, qui est réprimé par Dorsal (Fig. 2.25). Initialement, *dpp* et *zen* sont exprimés selon des patrons similaires, mais dès que le gradient d'activité de la protéine Dpp se met en place, l'expression du gène *zen* se restreint à la région où la signalisation de Dpp est la plus forte et induit la formation de l'amnioséreuse.

La protéine Dpp est d'abord produite uniformément dans toute la région dorsale quand débute la cellularisation, mais peu de temps après, son activité se concentre dans une bande de cinq à sept cellules dorsales et apparaît comparativement faible dans le futur ectoderme dorsal adjacent (Fig. 2.27). Ce pic de concentration de Dpp n'est pas qu'une question de simple diffusion. Il illustre comment un gradient fonctionnel peut s'établir à partir d'une distribution initiale relativement uniforme de la protéine par des interactions avec d'autres protéines. En outre, l'activité de Dpp semble pouvoir également être modifiée par des interactions avec des formes différentes de son récepteur, ce qui affine encore plus le gradient. La protéine interagit également avec le collagène de la matrice extracellulaire, ce qui limite sa diffusion et ainsi l'étendue de son action

La transition abrupte entre les cellules de l'ectoderme dorsal et celles qui lui sont latérales implique la protéine Sog (pour *Short gastrulation*), Tsg (pour *Twisted gastrulation*) et Tolloïd. Sog et Tsg sont des protéines apparentées aux BMP qui peuvent interagir avec Dpp et empêcher sa liaison avec ses récepteurs, inhibant ainsi son action. Tolloïd est une métalloprotéase qui dégrade Sog lorsqu'elle est liée à la Dpp, libérant ainsi Dpp.

Le gène *sog* est exprimé dans tout le futur neuroectoderme. L'interaction de Sog avec Dpp empêche l'activité de la protéine Dpp dans ce tissu. La protéine Sog diffusant dans la région dorsale est dégradée par Tolloïd produite dans toute la région dorsale. Ceci génère un gradient décroissant de Sog depuis le neuroectoderme jusqu'à la ligne médiane dorsale, et entraîne Sog, liée à Dpp, vers la région dorsale. La dégradation de Sog ou Tsg par Tolloïd libère Dpp, ce qui contribue à générer un gradient d'activité Dpp avec son point culminant dans la région dorsale de l'embryon (Fig. 2.27).

Un autre phénomène permettant probablement d'affiner le gradient de Dpp est l'internalisation et la dégradation rapides de Dpp une fois qu'elle est liée à ses récepteurs. L'activité de Dpp est aussi affectée par son interaction avec Screw, un membre



Fig. 2.27 L'activité de la protéine Decapentaplegic (Dpp) est limitée à la région la plus dorsale de l'embryon par l'activité antagoniste de la protéine Short gastrulation (Sog). À gauche : le gradient de la protéine Dorsal intranucléaire conduit à l'expression du gène *short gastrulation (sog)* dans l'ensemble du futur neuroectoderme. Les gènes *decapentaplegic (dpp)* et *tolloïd* sont exprimés dans l'ectoderme dorsal. Au centre : *sog* code une protéine Sécrétée, Sog, qui forme un gradient ventro-dorsal, tandis que la protéine Dpp sécrétée est initialement présente dans toute la région dorsale. La protéase Tolloïd (Tld) est produite dans la même région que Dpp. L'interaction entre Sog et Dpp empêche Dpp d'interagir avec ses récepteurs et sa signalisation de se propager ventralement dans le neuroectoderme. À droite : Dpp liée à Sog est également transportée vers la région dorsale suivant le gradient Sog en formation, ce qui permet de concentrer son activité dans la région la plus dorsale. Tld participe à la réalisation du pic d'activité dorsal de Dpp. Il se lie au complexe Sog-Dpp et clive Sog. Cela libère Dpp, qui peut ensuite se lier à ses récepteurs. La région dorsale est donc subdivisée, par l'activité de Sog, en une région de signalisation Dpp élevée, qui deviendra l'amnioséreuse, et une zone de signalisation Dpp moins forte, l'ectoderme dorsal.

D'après Ashe, H.L., Levine, M. : Local inhibition and long-range enhancement of Dpp signal transduction by Sog. Nature 1999, 398 : 427-431. de la famille TGF-β, qui forme des hétérodimères avec Dpp, plus actifs que les homodimères de Dpp ou Screw. Les hétérodimères sont probablement responsables de la plus grande part de l'activité de Dpp. Des observations expérimentales et des modèles mathématiques suggèrent que les hétérodimères se forment préférentiellement dans la région la plus dorsale, ce qui permet d'expliquer la forte activité de Dpp à cet endroit. Les homodimères de Dpp et ceux de Screw sont responsables du plus faible niveau de signalisation Dpp partout ailleurs dans le futur ectoderme dorsal.

Le couple Dpp/Sog a son équivalent chez les vertébrés, BMP-4/Chordin (Chordin est l'homologue de Sog chez les vertébrés), qui est aussi impliqué dans la formation de l'axe dorso-ventral. Le système nerveux central est dorsal chez les vertébrés, pas ventral comme chez les insectes. L'organisation de l'axe dorso-ventral et les patrons d'activité de BMP-4 et Chordin sont en conséquence inversés chez les vertébrés par rapport à celle des insectes (voir aussi Chapitre 4).

2.18 L'axe antéro-postérieur est subdivisé en grandes régions par l'expression des gènes gap

L'organisation des structures antéro-postérieures et dorso-ventrales débute quand l'embryon de drosophile est encore acellulaire. Les **gènes gap** sont les premiers gènes zygotiques exprimés le long de l'axe antéro-postérieur (Fig. 2.9), et codent tous des facteurs de transcription. Ces gènes ont été initialement identifiés sur la base des phénotypes mutants caractérisés par l'absence de larges parties contiguës le long de l'axe antéro-postérieur (voir la figure de l'Encart 2A). Bien que le phénotype mutant d'un gène gap montre en général une disparition de la région de l'axe antéro-postérieur dans laquelle le gène est normalement exprimé, on observe aussi d'autres effets liés au fait que l'expression des gènes gap est aussi essentielle pour le développement ultérieur de cet axe.

L'expression des gènes gap est initiée sous l'influence du gradient antéro-postérieur de Bicoïd, quand l'embryon est encore syncytial. Bicoïd active l'expression antérieure du gène gap *hunchback*, qui à son tour contrôle l'expression des autres gènes gap, comme *giant, Krüppel* et *knirps*, qui sont exprimés dans cet ordre le long de l'axe antéro-postérieur (Fig. 2.28) (*giant* est exprimé dans deux bandes de cellules, une antérieure, l'autre postérieure, mais son expression postérieure ne sera pas considérée ici).

La construction de l'axe antéro-postérieur sous contrôle transcriptionnel de bicoïd et des différents gènes gap est très similaire à ce que nous venons de voir pour Dorsal. Des gradients transitoires de facteurs de transcription sont formés : ces facteurs présentent différentes affinités pour divers gènes cibles, et les produits des gènes gap agissent de façon combinatoire avec d'autres facteurs de transcription. Puisque le blastoderme est encore acellulaire à ce stade, les protéines gap peuvent diffuser librement depuis leur site de synthèse. Ce sont des protéines éphémères avec des demi-vies à l'échelle de la minute. En conséquence, leur distribution s'étend seulement légèrement au-delà de la région où le gène gap correspondant est exprimé, et leur concentration répond à un profil de type courbe en cloche. Des interactions régulatrices croisées ont lieu au niveau des chevauchements entre zones de diffusion permettant d'affiner les domaines distincts de l'embryon. La protéine zygotique Hunchback est une exception, présente de manière homogène dans une large région antérieure, sa concentration chute brutalement à la frontière postérieure de sa zone d'expression. Le contrôle de l'expression de *hunchback* par Bicoïd est bien compris et sera abordé en premier.

2.19 La protéine Bicoïd délivre un signal de position qui contrôle l'expression antérieure du gène *hunchback* zygotique

La protéine Bicoïd induit l'expression du gène zygotique *hunchback* dans la moitié antérieure de l'embryon. Cette expression zygotique se superpose aux faibles concentrations des ARNm maternels de *hunchback*, dont la traduction est bloquée postérieurement par Nanos (Section 2.9).

La synthèse uniquement antérieure d'Hunchback répond à l'information positionnelle délivrée par le gradient de la protéine Bicoïd. Le gène *hunchback* est activé seulement quand le facteur de transcription Bicoïd est présent à un certain seuil de



Fig. 2.28 Expression des gènes gap hunchback, *Krüppel, giant, knirps* et *tailless* dans l'embryon précoce de la drosophile. L'expression des gènes gap en différents points de l'axe antéro-postérieur, est contrôlée par la concentration des protéines Bicoïd et Hunchback, ainsi que par les interactions entre les gènes gap eux-mêmes. Le profil d'expression des gènes gap génère un motif apériodique de facteurs de transcription le long de l'axe antéropostérieur, qui délimite grossièrement les régions du corps.

Fig. 2.29 La protéine Bicoïd maternelle contrôle l'expression de hunchback zygotique. Si la dose de *bicoïd* maternel est doublée, l'étendue du gradient Bicoïd augmente également. L'expression du gène *hunchback* est déterminée par la concentration seuil de Bicoïd, de sorte qu'à plus haute dose, sa région d'expression est étendue vers l'extrémité postérieure de l'embryon car la région dans laquelle la concentration de Bicoïd dépasse le seuil de concentration se déplace également postérieurement (voir le graphique, panneau inférieur). La position du sillon de tête, qui est représenté, est également décalée vers l'arrière à des doses croissantes de *bicoïd*, montrant la modification du plan corporel.

concentration. Ce niveau de concentration est atteint seulement dans la moitié antérieure de l'embryon, à proximité du site de synthèse de Bicoïd, ce qui confine l'expression de *hunchback* dans cette région.

L'expression de *hunchback* change quand le gradient de Bicoïd est modifié expérimentalement en augmentant le dosage génique de *bicoïd* maternel (Fig. 2.29). Dans ces conditions, l'expression de *hunchback* s'étend plus postérieurement car la région dans laquelle la concentration de Bicoïd est au-dessus du seuil pour l'activation de *hunchback*, s'étend aussi postérieurement.

Le gradient progressif et continu de Bicoïd est converti en un domaine d'expression bien délimité de hunchback dans la moitié antérieure de l'embryon. Des noyaux voisins le long de l'axe antéro-postérieur sont soumis à des concentrations de Bicoïd ne différant pas plus de 10 %. On peut s'en rendre compte en mesurant le gradient de Bicoïd et le patron d'expression de hunchback dans des embryons différents, ce qui permet d'apprécier la corrélation très précise entre la valeur de la concentration de Bicoïd et l'induction de l'expression de hunchback (Fig. 2.30). Se pose alors la question de savoir comment les noyaux peuvent distinguer de si petites différences de concentration pour former des blocs d'expression géniques aux limites si nettes dans un bruit de fond biologique (c'est-à-dire des fluctuations de facteurs de transcription aux environs d'un seuil de concentration) comme celui résultant des petites variations aléatoires de la régulation de la production de Bicoïd. Cet aspect a été analysé grâce à une construction Bicoïd-GFP (Section 2.8) pour observer directement la distribution et la concentration de Bicoïd dans les noyaux en différents points de l'axe antéro-postérieur. La distribution de Bicoïd, ses concentrations intranucléaires en différents points, et la frontière abrupte de l'expression de hunchback, s'avèrent être toutes très reproductibles dans un grand nombre d'embryons, ce qui suggère que le bruit de fond est en fait maintenu à un bas niveau dans l'embryon, grâce notamment à une communication internucléaire.

Bicoïd active l'expression de *hunchback* en se liant à des sites de fixation situés dans le promoteur du gène. Cette activation a pu être démontrée grâce à l'utilisation d'un gène de fusion comprenant à la fois le promoteur de *hunchback* et un gène rapporteur bactérien, *lacZ*. Ce gène de fusion a été introduit dans le génome de la mouche par transgénèse à l'aide de l'élément-P (Encart 2D ; d'autres techniques pour visualiser et modifier l'expression génique chez la drosophile sont décrites dans l'Encart 2E). Une

Fig. 2.30 Relation entre les concentrations de Bicoïd et de Hunchback (Hb). Les

photographies montrent la distribution de la protéine Bicoïd maternelle (en haut) et de la protéine Hb zygotique (en bas) dans les noyaux d'un embryon au stade blastoderme syncytial tardif. La présence des deux protéines est révélée en utilisant des anticorps spécifiques qui sont visualisés par des anticorps secondaires portant différents marqueurs fluorescents. L'intensité de la fluorescence est ensuite enregistrée séparément pour chaque protéine. Ces images apparaissent en fausses couleurs. Le graphique représente la concentration de Bicoïd par rapport à celle de Hb le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. De l'extrémité antérieure à environ 45 % de la longueur de l'embryon, la concentration de Bicoïd est égale ou supérieure au seuil requis pour activer l'expression du gène *hb.* À noter la chute brutale de la concentration de Hb dès que la concentration de Bicoïd est inférieure au seuil. Le gène *hb* a un second domaine d'expression dans la région la plus postérieure de l'embryon qui est indépendant de Bicoïd.

Clichés aimablement communiqués par J. Reinitz, M. Samsonova, and A. Pisarev. Reproduits avec l'autorisation de Reinitz, J. A ten per cent solution. Nature. 2007, 448 : 420-421.















Fig. 2.32 Le domaine d'expression de *Krüppel* dépend du gradient de la protéine Hunchback. Embryon coloré avec des anticorps fluorescents pour détecter simultanément le gradient de la protéine Hb (en rouge) et la présence de l'ARNm *Krüppel* (en vert) au début du cycle nucléaire 14.

D'après Yu, D., and Small, S. : **Precise** registration of gene expression boundaries by a repressive morphogen in Drosophila. Curr. Biol, 2008, **18** : 868-876. **Fig. 2.31** L'activité du gène *Krüppel* est spécifiée par la protéine Hunchback. En haut : au-dessus d'une concentration seuil de la protéine Hunchback, l'expression du gène *Krüppel* est réprimée. À une concentration inférieure, au-dessus d'une autre valeur de seuil, elle est activée. En bas : chez les mutants dépourvus du gène *bicoïd* et donc dépourvus de l'expression zygotique de *hunchback*, seule la protéine Hunchback maternelle est présente, à un niveau relativement bas, à l'extrémité antérieure de l'embryon. Chez ces mutants, *Krüppel* est anormalement activé à l'extrémité antérieure de l'embryon.

séquence de 263 paires de bases inclue dans le promoteur est nécessaire et suffisante pour une activation normale de l'expression de *hunchback*. Cette séquence peut lier Bicoïd en plusieurs endroits, et il paraît probable que le seuil de réponse à Bicoïd implique une **coopérativité** entre les différents sites de liaison. En effet, la liaison de Bicoïd à un de ses sites de fixation rend celle-ci plus facile sur les sites voisins et augmente donc sa fixation sur ces derniers.

La région régulatrice d'un gène tel que *hunchback* représente un autre exemple de commutateur capable d'engager les noyaux dans une nouvelle voie de développement. Des leviers moléculaires opérationnels de ce type sont très répandus au cours du développement embryonnaire.

2.20 Le gradient de la protéine Hunchback active et réprime l'expression d'autres gènes gap

La protéine Hunchback est un facteur de transcription et agit comme un morphogène sur l'expression des autres gènes gap. Leurs zones d'expression forment des bandes transversales parfaitement délimitées le long de l'axe antéro-postérieur. Ces bandes sont définies par des mécanismes qui dépendent des régions de régulation des gènes gap qui sont sensibles à différentes concentrations de la protéine Hunchback, et aussi à d'autres protéines, comme Bicoïd qui contribue à l'affinement du patron d'expression génique. L'expression du gène *Krüppel* par exemple est activée par des niveaux faibles Hunchback, mais réprimée par de fortes concentrations de la même protéine. Entre ces deux niveaux de Hunchback, *Krüppel* est exprimé et actif (Fig. 2.31, en haut). En revanche, en dessous d'un seuil inférieur de Hunchback, *Krüppel* n'est pas exprimé. De cette façon, le gradient de protéine Hunchback permet de positionner la bande d'activité du gène *Krüppel* vers le centre de l'embryon (Fig. 2.32). La précision du positionnement de cette bande d'activité dépend de la répression de l'expression de *Krüppel* par d'autres protéines gap.

Le rôle d'Hunchback a pu être caractérisé en altérant son profil de concentration dans l'embryon, alors que d'autres influences connues y étaient simultanément éliminées ou maintenues constantes. L'augmentation expérimentale de Hunchback, par exemple, résulte en un décalage postérieur de son gradient de concentration qui produit un décalage postérieur du domaine d'expression de *Krüppel*. Dans une autre série d'expériences menées sur des embryons dépourvus de Bicoïd (de sorte que seul persiste le gradient de Hunchback maternel), le niveau de Hunchback est tellement bas que le gène *Krüppel* est même activé à l'extrémité antérieure de l'embryon (Fig. 2.31, en bas).

La protéine Hunchback est aussi impliquée dans la spécification des bords antérieurs des bandes d'expression des gènes gap *knirps* et *giant*, de nouveau *via* un mécanisme impliquant des seuils de concentration pilotant la répression et l'activation de ces gènes. À des niveaux élevés de Hunchback, *knirps* est réprimé, ce qui détermine le bord antérieur de sa zone d'expression. La frontière postérieure de la bande d'expression de *knirps* est spécifiée par un mécanisme similaire impliquant le gène gap *tailless*. Aux endroits où les régions d'expression des gènes gap se chevauchent, il existe une très forte inhibition entre ces gènes qui codent tous des facteurs de transcription. Ces interactions sont essentielles pour affiner et stabiliser les patrons d'expression des gènes gap. Par exemple, le bord antérieur de la zone d'expression de *Krüppel* se situe à 4-5 noyaux de distance derrière ceux qui expriment *giant*, et est établi par de faibles concentrations de la protéine Giant.

ENCART 2D Transgénèse s'effectuant par l'intermédiaire de l'élément P

La transgénèse est un outil essentiel en génétique du développement chez la drosophile. Elle consiste à insérer une séquence connue d'ADN dans l'ADN chromosomique de la drosophile, en utilisant comme vecteur un élément transposable (transposon) qui se transpose spontanément dans certaines souches de drosophiles. Ce transposon est connu sous le nom d'élément P, et la technique comme transgénèse s'effectuant par l'intermédiaire de l'élément P (Figure 1).

Les éléments P peuvent s'insérer à n'importe quel site d'un chromosome et peuvent aussi se transposer d'un site à un autre dans les cellules germinales, une action qui réclame la présence d'une enzyme appelée transposase. Comme ce mécanisme est susceptible de générer de l'instabilité génomique, on a retiré aux éléments P servant de vecteur de transgénèse le gène codant la transposase. La transposase nécessaire à l'insertion initiale de l'élément P est fournie par un élément P dit « *helper* », qui ne peut pas s'insérer dans le génome, et est donc rapidement éliminé. Les éléments P « vecteur » et « *helper* » sont injectés ensemble dans la partie postérieure de l'œuf où se forment les cellules germinales.

Est ajouté à l'élément P, en plus du gène à insérer, un gène marqueur, tel que le gène sauvage *white*⁺. Quand *white*⁺ est le marqueur, l'élément P est inséré chez des mouches homozygotes pour le gène mutant *white*⁻ (qui ont des yeux blancs à la place des yeux rouges de la drosophile sauvage). Les yeux rouges constituent un caractère dominant sur les yeux blancs, et ainsi les mouches, chez lesquelles l'élément P a été inséré et est exprimé, peuvent être identifiées grâce à leurs yeux rouges.

À la première génération, toutes les mouches ont les yeux blancs, l'élément P intégré n'étant présent encore que dans les cellules germinales. Mais à la seconde génération, quelques mouches auront des yeux rouges révélant la présence de l'élément P dans leurs cellules somatiques.

Cette technique a été utilisée pour accroître le nombre de copies d'un gène d'intérêt, ou pour introduire un gène muté présentant une modification spécifique dans ses **régions codantes** ou régulatrices, ou encore pour faire s'exprimer un gène nouveau. Il est également possible de transférer des gènes associés à une séquence « rapportrice » comme *lacZ* (codant l'enzyme bactérienne β -galactosidase), dont l'expression est détectable par marquage histochimique (Encart 1D). L'élément P a également été utilisé comme mutagène car son insertion dans un gène inactive généralement celui-ci.

Cette approche a été utilisée pour des criblages à grande échelle de gènes dont la surexpression ou l'expression incorrecte dans un tissu particulier est la cause d'un phénotype mutant (Encart 2E). C'est un criblage basé sur la surexpression et l'expression ectopique des gènes. Dans ce cas, des mouches produisant Gal4 dans le tissu d'intérêt sont croisées avec différentes souches de mouches portant des insertions au hasard du site de fixation de Gal4, et leur progéniture



analysée pour rechercher un phénotype mutant. Cette approche est un complément utile au criblage génétique plus conventionnel décrit dans l'Encart 2A, qui permet de détecter des mutations de perte de fonction. Si les mouches cibles portent aussi une mutation dans un gène connu, le criblage surexpression/expression ectopique peut être utilisé pour identifier des gènes dont la surexpression accentue ou supprime les effets de la mutation. Cette approche permet d'identifier des gènes dont les produits interagissent directement ou qui font partie de la même voie.

ENCART 2E Expression de gènes cibles et dépistage de défauts d'expression

La possibilité d'activer l'expression d'un gène en un lieu donné et à un moment particulier de la formation de l'embryon est très utile pour analyser le rôle du gène au cours du développement. Ceci peut être réalisé de différentes façons. L'une d'elle consiste à associer au gène d'intérêt un promoteur de choc thermique (heat-shock promoter) en utilisant des techniques génétiques classiques comme la transgénèse via l'élément P (Encart 2D). Ceci permet au gène d'être exprimé suite à une brusque élévation de la température à laquelle les embryons sont maintenus. En contrôlant le moment d'élévation de la température, on contrôle temporellement l'expression du gène attaché à ce promoteur, ce qui permet d'étu-



dier les effets de l'expression d'un gène à différents stades du développement.

Une autre approche expérimentale passe par l'utilisation du facteur de transcription de levure Gal4. Cette protéine peut activer la transcription de n'importe quel gène dont le promoteur porte un de ses sites de fixation. Chez la drosophile, des gènes porteurs d'un promoteur sensible à Gal4 peuvent être générés en insérant un site de liaison à Gal4. Pour activer le gène cible, Gal4 doit être lui-même produit dans l'embryon. Gal4 peut être produit éventuellement dans une région choisie de l'embryon, ou à un moment particulier de son développement, en introduisant un élément P dans lequel la région codante de Gal4 est attachée à une région régulatrice de drosophile connue pour être active dans cette situation (Figure 1).

Une deuxième approche, plus polyvalente, est basée sur la technique *enhancer-trap*. La séquence codante de Gal4 est insérée dans un vecteur qui s'intègre de façon aléatoire dans le génome de la drosophile. Le gène *Gal4* va être contrôlé par le promoteur et l'*enhancer* adjacents à son site d'intégration, de sorte que la protéine Gal4 est produite à l'endroit, ou au moment, où ce gène est normalement produit. Un grand nombre de lignées de drosophiles présentant différents patrons d'expression de Gal4 ont été ainsi produites. Le gène d'intérêt ne sera pas exprimé en l'absence de Gal4. Pour que son expression soit activée dans un tissu particulier, par exemple, des mouches qui produisent Gal4 dans ce tissu sont croisées avec des mouches dans lesquelles le gène d'intérêt a des sites de liaison à Gal4 dans sa région régulatrice.

Un nouveau patron d'expression génique peut être également obtenu en utilisant le système Gal4. Par exemple, le gène pairrule *even-skipped* a été exprimé dans les parasegments pairs plutôt que dans les parasegments impairs, ceci conduisant à des changements dans les motifs de denticules présents sur la cuticule.

L'axe antéro-postérieur se divise progressivement en une série de régions uniques caractérisées par des facteurs de transcription qui forment des gradients de concentration chevauchants. Cette méthode particulière de délimitation de territoires ne peut se faire que dans un embryon syncytial, comme c'est le cas de la drosophile, dans lequel les facteurs de transcription peuvent diffuser librement. Cependant, comme il sera vu pour d'autres organismes, la subdivision progressive de l'embryon en régions d'abord grossières puis plus fines est un principe général du développement, même si les mécanismes impliqués peuvent être très différents.

Chez la drosophile, la production localisée des protéines gap constitue le point de départ pour les étapes suivantes du développement le long de l'axe antéro-postérieur : l'activation des gènes pair-rule, la cellularisation, et le début de la segmentation.

RÉSUMÉ

Des gradients de facteurs transcription maternels génèrent des informations de position le long des axes dorso-ventral et antéro-postérieur et activent des gènes zygotiques en des lieux précis le long de ces axes. Dans le sens antéro-postérieur, le gradient maternel de Bicoïd déclenche l'activation des gènes gap zygotiques permettant de spécifier les grandes régions du corps. Des interactions entre les gènes gap et leurs produits, codant tous des facteurs de transcription, permettent de définir leurs frontières d'expression. L'axe dorso-ventral se subdivise en quatre régions : le mésoderme ventral, l'ectoderme ventral (neuroectoderme), l'ectoderme dorsal (épiderme dorsal), et l'amnioséreuse. Un gradient ventro-dorsal de la protéine maternelle Dorsal spécifie le mésoderme ventral et définit la région dorsale. Un deuxième gradient formé par la protéine Decapentaple-gic structure l'ectoderme dorsal. L'embryon est ainsi subdivisé le long des axes dorso-ventral et antéro-postérieur en un certain nombre de régions, chacune d'elle étant caractérisée par un patron unique d'expression de gènes zygotiques.



Activation des gènes pair-rule et établissement des parasegments

La caractéristique la plus frappante de la larve de drosophile est la segmentation de la cuticule de la larve le long de l'axe antéro-postérieur, chaque segment, par exemple ceux formant le thorax ou l'abdomen, portant des structures cuticulaires qui le définissent précisément. Ce patron de segmentation de la cuticule reflète l'organisation de l'épiderme sous-jacent, qui produit la cuticule et ses structures. Plus généralement, il reflète l'organisation segmentaire, c'est-à-dire métamérisée, du corps de la larve, au sein duquel, le système respiratoire (abordé au Chapitre 11), le système nerveux, et les muscles pariétaux sont organisés de façon modulaire.

Chaque segment acquiert une identité unique dans l'embryon, et la forme et l'identité des segments sont transférées chez l'adulte à la métamorphose. Les appendices de l'adulte comme les ailes, les haltères et les pattes, sont attachés à des segments particuliers, mais les segments visibles sur la larve après l'éclosion ne sont pas les premières structures répétées à apparaître. Les structures répétées initiales, qui seront définies plus précisément dans la Section 2.21, sont les parasegments, présents chez l'embryon et qui sont à l'origine des segments.

2.21 Les parasegments sont délimités par les patrons d'expression périodiques des gènes pair-rule

Les sillons transitoires qui apparaissent à la surface de l'embryon après la gastrulation constituent les premiers signes tangibles de la segmentation. Ces sillons définissent 14 parasegments. Dès qu'un parasegment est formé, il se comporte comme une entité indépendante. Cette situation fait de l'embryon une construction de type modulaire. Les parasegments sont initialement similaires quant à leurs capacités potentielles de développement, mais chacun va acquérir rapidement une identité propre. Les parasegments présentent un décalage d'un demi-segment avec les segments définitifs observés aux stades embryonnaires tardifs et chez la larve. Ainsi, chaque segment est constitué de la région postérieure d'un parasegment et de la partie antérieure du suivant. Les relations entre parasegments, segments larvaires, et identité segmentaire chez la mouche adulte sont illustrées dans la Fig. 2.33. Dans la région antérieure de la tête, l'organisation segmentaire est perdue suite à la fusion de certains parasegments antérieurs.

Les parasegments du thorax et de l'abdomen sont délimités par l'action des **gènes pair-rule**. Chacun de ces gènes est exprimé sous forme de sept bandes transversales le long de l'embryon, celles-ci étant disposées tous les deux parasegments. Quand l'expression des gènes pair-rule est visualisée *via* l'immunomarquage de leurs protéines, un étrange embryon zébré apparaît (Fig. 2.34).

La position des bandes d'expression des gènes pair-rule est déterminée par la distribution des gènes gap. Curieusement, un patron d'activité non répétitif de gènes gap est converti en un patron d'expression répétitif de gènes pair-rule. Les raisons de ce phénomène vont être examinées.

2.22 L'activité des gènes gap détermine la position des bandes d'expression des gènes pair-rule

Les patrons d'expression des gènes pair-rule forment des bandes transversales dont la périodicité correspond à l'alternance des parasegments. Les mutations touchant ces gènes, identifiées à l'origine par leur capacité à créer des discontinuités périodiques du tissu larvaire (Encart 2A), affectent un segment sur deux. Certains gènes pair-rule (par exemple *even-skipped (eve)*), définissent les parasegments impairs, alors que d'autres (par exemple *fushi tarazu*) définissent les parasegments pairs (Fig. 2.34). Ce patron d'expression en bandes survient au stade blastoderme syncytial peu de temps avant la cellularisation. Chaque gène pair-rule est exprimé au niveau de sept bandes de quelques noyaux puis de cellules de largeur. Pour certains gènes pair-rule, comme *eve*, la frontière antérieure de la bande correspond à la frontière antérieure d'un parasegment. Le domaine d'expression d'autres gènes pair-rule s'étend cependant au-delà des frontières des parasegments.

L'expression en bandes apparaît graduellement. Les limites des bandes formées par l'expression de *eve* sont d'abord floues, mais elles s'affinent en générant une frontière antérieure précise. À première vue, on pourrait associer ce type d'organisation à un processus sous-jacent de nature périodique, celui par exemple défini par une alternance de niveaux de concentration d'un morphogène, chaque bande se formant aux endroits où ces niveaux sont les plus élevés. Ce fut une surprise de constater au contraire, que chaque bande est spécifiée de façon indépendante.

La seconde bande d'expression de *eve* va servir d'exemple pour illustrer la manière dont les bandes pair-rule sont formées, (Fig. 2.35). L'apparition de cette bande dépend de la présence de Bicoïd et de l'expression des trois gènes gap *hunchback*, *Krüppel* et



giant (seule la bande d'expression antérieure de *giant* est impliquée dans la spécification de la seconde bande de *eve*; Fig. 2.28). Bicoïd et Hunchback sont deux protéines requises pour activer l'expression du gène *eve*, mais elles ne définissent pas les frontières des bandes. Celles-ci sont définies par Krüppel et Giant, *via* un mécanisme basé



Fig. 2.33 Relation entre parasegments et segments chez le jeune embryon, l'embryon âgé et la mouche adulte.

L'expression des gènes pair-rule spécifie les parasegments au niveau des futurs thorax et abdomen, et quelques parasegments de la tête chez l'embryon. even-skipped (en jaune), par exemple, spécifie les parasegments impairs. Le gène sélecteur engrailed (en bleu) est exprimé dans la région antérieure de chaque parasegment et délimite le bord antérieur de chaque parasegment. Lorsque la segmentation se produit, la région antérieure d'un parasegment devient la partie postérieure d'un segment. Chaque segment larvaire est donc composé de la région postérieure d'un parasegment et de la région antérieure du suivant. Les segments sont ainsi décalés d'environ un demi-segment par rapport aux parasegments originaux. engrailed continue d'être exprimé dans la région postérieure de chaque segment à tous les stades larvaires et chez l'adulte. Dans cette figure, a et p désignent les régions antérieures et postérieures des segments finaux. La spécification du segment est transmise à l'adulte et se traduit par la présence d'appendices particuliers, telles que des pattes, des ailes et des pièces buccales qui se développent uniquement sur des segments spécifiques. C1, segment mandibulaire ; C2, segment maxillaire ; et C3, segment labial. Le segment mandibulaire adulte n'a pas d'appendice. T, segments thoraciques ; A, segments abdominaux.

Illustration d'après Lawrence, P. : The Making of a Fly. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992.

Fig. 2.34 Bandes d'expression des gènes pair-rule dans l'embryon juste avant la cellularisation. Les parasegments sont délimités par l'expression des gènes pair-rule, chaque gène pair-rule étant exprimé dans des parasegments alternés. L'expression des gènes pair-rule *even-skipped* (bleu) et *fushi tarazu* (marron) est visualisée par coloration avec des anticorps dirigés contre les protéines qu'ils codent. *even-skipped* est exprimé dans les parasegments impairs, *fushi tarazu* dans les parasegments pairs. Barre d'échelle = 0,1 mm.

D'après Lawrence, P. : The Making of a Fly. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992. Fig. 2.35 Spécification de la deuxième bande d'expression d'even-skipped (eve) par les protéines gap. Les différentes concentrations de facteurs de transcription codés par les gènes gap hunchback, giant et Krüppel contrôlent l'expression de even-skipped dans une bande étroite à un point particulier le long de leurs gradients et correspondant au parasegment 3. Les protéines Bicoïd et Hunchback activent l'expression de eve dans un large domaine, et les frontières antérieures et postérieures de la bande sont définies par la répression du gène, respectivement, par les protéines Giant et Krüppel.



sur la répression de l'expression de *eve*. Quand les concentrations de Krüppel et Giant sont au-dessus d'un certain seuil, l'expression de *eve* est réprimée, même si Bicoïd et Hunchback sont présentes. Le bord antérieur de la bande est localisé au point de concentration seuil de Giant, et le bord postérieur à celui de Krüppel.

Au contraire, le positionnement de la troisième et quatrième bande de *eve* dépend de régions régulatrices qui sont réprimées par la forte concentration de Hunchback dans la région antérieure. La troisième bande se forme à peu près au milieu de l'embryon, là où la concentration de Hunchback commence à chuter, tandis que la quatrième bande *eve* se forme plus postérieurement, là où la concentration de Hunchback est encore plus faible (Fig. 2.36). La frontière postérieure de la troisième bande de *eve* est délimitée par la répression de l'expression de *eve* par la protéine gap Knirps.

Le positionnement indépendant des différentes bandes implique que, pour chacune d'entre elles, les gènes pair-rule soient capables de répondre à différentes concentrations et combinaisons de facteurs de transcription codés par les gènes gap. Ainsi, l'expression des gènes pair-rule est contrôlée par des régions *cis*-régulatrices complexes contenant de multiples sites de fixation pour différentes protéines gap. Nous avons vu précédemment comment de telles régulations peuvent conduire à l'organisation de régions distinctes grâce à la protéine Dorsal le long de l'axe dorso-ventral. L'analyse des régions régulatrices du gène *eve*, révèle cinq modules distincts, chacun contrôlant le positionnement d'une ou deux bandes. Des régions régulatrices d'environ 500 paires de base contrôlant la formation d'une bande unique ont pu aussi être caractérisées. Le gène *eve* constitue un excellent exemple de la façon dont des régions *cis*-régulatrices modulaires contrôlent l'expression d'un gène en des régions multiples.



Fig. 2.36 Positionnement de la troisième et de la quatrième bande d'expression de eve par le gradient Hunchback. Embryon coloré avec des anticorps fluorescents permettant de détecter simultanément la protéine Hb (en rouge) et l'ARNm de son gène cible eve (en vert). Les positions des troisième et quatrième bandes d'expression de eve sont dues directement à l'absence de répression de eve par Hunchback dont le gradient chute brusquement.

D'après Yu, D., and Small, S. : **Precise registration of gene expression boundaries by a repressive morphogen in Drosophila.** Curr. Biol, 2008, **18** : 868–876.



Fig. 2.37 Sites de fixation des facteurs de transcription activateurs et répresseurs dans la région régulatrice du gène eve impliqués dans la formation de la deuxième bande d'expression de eve. Une région régulatrice d'environ 500 paires de bases, située entre les nucléotides 1 070 et 1 550 en amont du site d'initiation de la transcription, dirige la formation de la deuxième bande d'expression de *eve*. L'expression du gène peut se produire lorsque les facteurs de transcription Bicoïd et Hunchback, agissant comme activateurs, sont présents au-dessus d'une concentration seuil donnée. Cependant, même en présence de Bicoïd et Hunchback, le gène est réprimé lorsque les protéines Giant et Krüppel, agissant en tant que répresseurs, sont au-dessus de certains seuils. Ces derniers fixent donc les limites de la bande d'expression (Fig. 2.35). Les répresseurs peuvent agir en empêchant la fixation des activateurs dans la région régulatrice du gène.

Les gènes du développement présentent la caractéristique de contenir des régions de régulation de la transcription permettant un contrôle spatial précis de leur expression. Il a été précédement vu ce type de régulation à l'œuvre pour les gènes gap et certains autres gènes le long de l'axe dorso-ventral. Les régions régulatrices présentent des sites de fixation pour des facteurs de transcription, lesquels ont le pouvoir d'activer ou de réprimer la transcription du gène. De cette manière les protéines gap sont capables de réguler de façon combinatoire l'expression des gènes pair-rule dans chaque parasegment. Notons que l'expression de certains gènes pair-rule, comme *fushi tarazu*, ne dépend pas directement des protéines gap, mais plutôt de l'expression préalable de gènes pair-rule « primaires », comme eve et hairy. Quoi qu'il en soit, on observe une parfaite synchronisation entre l'expression des gènes pair-rule et le début de la mise en place de la segmentation. Si on rajoute l'organisation dorso-ventrale à cette initiation de la segmentation, on peut considérer que l'embryon est à présent formé de régions avec un potentiel de développement caractéristique. Celles-ci sont principalement définies par les combinaisons de facteurs de transcription présents, principalement les protéines issues des gènes gap, des gènes pair-rule, et des gènes exprimés le long de l'axe dorso-ventral.

Les facteurs de transcription pair-rule dessinent le cadre spatial de la prochaine phase d'expression génique. Des combinaisons de leurs activités individuelles conduiront, aux frontières de chaque parasegment, à l'expression de gènes de segmentation codant des facteurs de transcription et des molécules de signalisation. L'action des produits des gènes de segmentation va permettre de délimiter et modeler les parasegments, et ainsi les futurs segments. Les protéines pair-rule, conjointement avec les protéines gap, vont également spécifier des identités cellulaires régionales qui vont générer des spécialisations fonctionnelles. L'existence de différentes façons de spécifier les segments chez les insectes sera abordée brièvement, avant de considérer ensuite ces interactions régulatrices et leurs conséquences chez la drosophile.

2.23 Les insectes utilisent différents mécanismes pour modeler leur architecture corporelle

La drosophile appartient à un groupe évolué d'insectes pour lesquels les segments sont tous spécifiés plus ou moins au même moment du développement, comme l'indiquent l'expression en bandes des gènes pair-rule dans le blastoderme syncytial et l'apparition de tous les segments peu de temps après la gastrulation. Ce type de développement est appelé « **développement à bandelette germinative longue** », car le blastoderme participe dans son intégralité à la formation de l'embryon. Beaucoup



Fig. 2.38 Différences dans le développement des insectes à bandelette germinative longue et courte. En haut : la carte des territoires présomptifs des insectes à bandelette germinative longue comme la drosophile, montre que l'ensemble du plan du corps, - tête (T), thorax (Th) et abdomen (Ab) - est présent au moment de la formation initiale de la bandelette germinative. En bas : chez les insectes à bandelette germinative courte, seules les régions antérieures du plan du corps sont présentes à ce stade embryonnaire. La plupart des segments abdominaux se développent plus tardivement, après la gastrulation, à partir d'une zone de croissance postérieure (Zc).

Fig. 2.39 Expression des gènes gap et pair-rule chez les insectes à bandelette germinative longue et courte au moment de la formation de la bandelette germinative. Krüppel (en rouge) est un gène gap et hairy (en vert) est un gène pairrule. La position de la bande d'expression de Krüppel dans l'embryon bandelette germinative courte *Tribolium* indique que les régions postérieures du corps ne sont pas encore présentes à ce stade. De même, seulement trois bandes d'expression de hairy, correspondant aux trois premières bandes d'expression de hairy d'un embryon à bandelette germinative longue, sont présentes chez Tribolium.

d'autres insectes, par exemple le coléoptère *Tribolium* (« ver de farine »), ont un « **développement à bandelette germinative courte** ». Dans ce dernier cas, le blastoderme ne forme que les segments antérieurs. Les segments postérieurs sont ajoutés lors d'une phase de croissance qui survient après le stade blastoderme et la gastrulation (Fig. 2.38). Malgré ces différences précoces dans la mise en place des segments, les bandelettes germinatives d'embryons plus matures se ressemblent, et représentent donc un stade commun de développement de tous les insectes. Comme il a été souligné précédemment, *bicoïd* est un gène présent uniquement dans un sous-groupe d'insectes et donc apparu assez récemment au cours de l'évolution. Dans l'embryon de la guêpe *Nasonia* à bandelette germinative longue, des gradients d'une protéine beaucoup plus ancienne (Orthodenticle) modèle les régions antérieure et postérieure, à la façon de Bicoïd chez *la drosophile*.

Il est important de pouvoir distinguer les mécanismes de spécification du plan de l'organisme qui sont communs à tous les insectes et ceux qui ne le sont pas. Par exemple, l'organisation du plan du corps chez la drosophile (bandelette germinative longue) se met en place bien avant la cellularisation, alors que chez les insectes à bandelette germinative courte, le plan du corps est pour une grande part établi plus tard, au moment où les segments postérieurs sont formés, c'est-à-dire quand l'embryon n'est plus syncytial mais cellulaire. Ces configurations distinctes impliquentelles quand même les mêmes gènes ?

Selon toute évidence, oui. Beaucoup des gènes et des processus du développement impliqués dans le modelage de l'embryon chez la drosophile le sont aussi chez *Tribolium*. Par exemple, le gène gap *Krüppel* est exprimé à l'extrémité postérieure de l'embryon de *Tribolium* au stade blastoderme, ce qui correspond à la région centrale chez la drosophile où ce gène est effectivement exprimé. (Fig. 2.39). Ce gène semble donc spécifier la même région du corps chez les deux insectes. On n'observe que deux répétitions de bandes d'expression des gènes pair-rule chez *Tribolium* contre sept chez la drosophile, en conformité avec la différence du nombre de segments entre ces deux espèces à ce stade. Les gènes de segmentation *wingless* et *engrailed*, qui seront vus un peu plus loin, sont aussi exprimés dans le même contexte fonctionnel chez les deux espèces.

Il existe une grande variété d'insectes à bandelette germinative courte, avec différentes longueurs de l'axe antéro-postérieur spécifiées au stade blastoderme. La drosophile est un cas à part : tous ses segments sont spécifiés en même temps, et elle possède Bicoïd, une protéine absente chez d'autres insectes et qui, présente, constitue un moyen pour la mesure de la taille de l'organisme.

Chez les insectes autres que la drosophile et *Tribolium*, les gènes impliqués dans la segmentation et la mise en place du plan d'organisation de l'embryon ont été relativement peu étudiés. On sait cependant que le gène *engrailed*, exprimé dans la région postérieure de chaque segment chez la drosophile, est aussi exprimé dans la région postérieure des segments chez différents autres insectes. En revanche, le gène pairrule *eve* (Section 2.22), bien que présent chez la sauterelle (un insecte à bandelette germinative courte), ne semble pas avoir le même rôle dans la segmentation. Il est toutefois impliqué plus tardivement dans le développement du système nerveux chez la sauterelle et il est aussi exprimé à l'extrémité postérieure de la bandelette germinative.



Des différences dans le développement précoce sont beaucoup plus marquées chez d'autres insectes. Chez certaines guêpes parasites, l'œuf est petit et subit des clivages jusqu'à former une boule de cellules qui finit par se désagréger. Les 400 petits groupes cellulaires qui en sont issus peuvent former chacun un embryon complet. La spécification des axes embryonnaires ne nécessite pas ici d'informations maternelles pour être établie, ce qui ressemble plus à la situation rencontrée chez l'embryon précoce de mammifère.

RÉSUMÉ

L'activation de l'expression des gènes pair-rule par les protéines gap conduit à la transformation de l'organisation embryonnaire le long de l'axe antéro-postérieur. Celle-ci passe d'une régionalisation variable à une régionalisation de type périodique. Les gènes paire-rule définissent 14 parasegments. Chaque parasegment est défini par des bandes d'expression des gènes pair-rule. Ces bandes sont spécifiées par la concentration locale des facteurs de transcription gap agissant sur la région régulatrice des gènes pair-rule. Chaque gène pair-rule est exprimé dans un parasegment sur deux, certains gènes uniquement dans les parasegments impairs, d'autres dans les pairs. La plupart des gènes pair-rule code des facteurs de transcription. À la différence de la drosophile, certains insectes ont un développement du type *bandelette germinative courte* pendant lequel les segments postérieurs sont ajoutés secondairement au cours d'un processus de croissance après le stade blastoderme cellulaire.



Les gènes de polarité segmentaire et l'organisation des segments

L'expression des gènes pair-rule définit les limites antérieures et postérieures des parasegments, mais comme les gènes gap, leur activité n'est que temporaire. Dans ces conditions, qu'est-ce qui permet de stabiliser ces frontières parasegmentaires et l'établissement des segments chez la larve ? C'est ici qu'interviennent les gènes de polarité segmentaire. L'expression de ces derniers sont activés en réponse aux gènes pair-rule. Au moment où les gènes pair-rule sont exprimés, le blastoderme se cellulaire plutôt que syncytial. À la différence des gène gap et pair-rule, qui agissent dans ce dernier et qui codent tous des facteurs de transcription, les gènes de polarité segmentaire codent des protéines de signalisation, leurs récepteurs, ou encore des facteurs de transcription, et permettent collectivement une communication intercellulaire.

2.24 L'expression du gène *engrailed* définit les frontières parasegmentaires qui sont également des limites de restriction clonale

Le gène *engrailed* code un facteur de transcription clef dans l'établissement et le maintien des frontières parasegmentaires. A la différence des gènes gap et pair-rule, dont



Fig. 2.40 Expression des gènes fushi tarazu (en bleu), even-skipped (en rose) et engrailed (points violets) dans les parasegments. engrailed est exprimé dans la partie antérieure de chaque bande et délimite le bord antérieur de chaque parasegment. Les limites des parasegments deviennent plus nettes et plus rectilignes plus tardivement.

D'après Lawrence, P. : The Making of a Fly. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992.

Fig. 2.41 Expression du gène *engrailed* **dans un embryon tardif (stade 11) de drosophile.** Le gène est exprimé dans la région antérieure de chaque parasegment et des sillons transitoires entre parasegments sont visibles. À ce stade de développement, la bandelette germinative de l'embryon s'est temporairement étendue et recourbée dorsalement. Barre d'échelle = 0,1 mm.

D'après Lawrence, P. : The Making of a Fly. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992. l'activité est transitoire, *engrailed* est exprimé tout au long de la vie de la mouche. Son expression initiale est retrouvée dans 14 bandes transversales de cellules au stade blastoderme cellulaire. L'expression d'*engrailed* dans ces cellules coïncide avec celles des gènes pair-rule *fushi tarazu* et *eve*, et délimite la marge antérieure de chaque parasegment. Ces parasegments n'ont encore qu'une largeur de quatre cellules à ce moment-là (Fig. 2.40). La Fig. 2.41 montre que l'expression d'*engrailed* coïncide avec la formation transitoire d'un sillon parasegmentaire à la fin de l'extension de la bandelette germinative, quand une partie du blastoderme ventral (la bandelette germinative) s'est repliée sur la partie dorsale de l'embryon.

Le contrôle de l'expression d'*engrailed* par les gènes pair-rule est illustré notamment par les embryons portant des mutations de *fushi tarazu* chez lesquels il n'y a pas d'expression d'*engrailed* dans les parasegments pairs, dans lesquels *fushi tarazu* est aussi normalement exprimé.

Les bords antérieurs des parasegments délimités par *engrailed* constituent aussi des frontières de **restriction clonale**. En d'autres termes, les cellules et leurs descendantes dans un parasegment ne se déplacent jamais vers un parasegment voisin. Ces domaines de restriction clonale sont appelés « **compartiments** ». Un compartiment peut être défini comme une région particulière qui contient toutes les cellules filles issues spécifiquement des cellules présentes au moment de la formation de ce compartiment et aucune autre. Le compartiment se comporte donc comme une unité cellulaire, dans laquelle les cellules expriment des gènes qui permettent au compartiment d'exprimer une identité particulière par rapport aux autres compartiments. Caractérisés originellement dans les structures épidermiques de la drosophile, ces compartiments ont aussi été décrits par la suite dans les membres et le cerveau en développement des vertébrés (Chapitres 11 et 12).

La présence de compartiments chez la drosophile peut être révélée par des études de lignage dans lesquelles une cellule unique est marquée de telle façon que le marqueur est transmis à toutes les cellules filles, formant un **clone**, qui peuvent ainsi être suivies dans des structures spécifiques au fur et à mesure des divisions cellulaires. Il est possible d'injecter une molécule fluorescente non toxique dans l'œuf qui sera incorporée dans toutes les cellules de l'embryon. Dans le jeune embryon, un rayon ultraviolet dirigé sur une cellule particulière active la molécule fluorescente. Toutes les cellules filles descendant de cette cellule seront fluorescentes et pourront ainsi être identifiées. L'examen de ces clones cellulaires, parallèlement à l'expression d'*engrailed*, montre que les cellules de la frontière antérieure des parasegments n'ont pas de descendantes de l'autre côté de cette frontière. Le bord antérieur constitue donc bien une frontière de restriction clonale. Autrement dit, les cellules et leurs descendantes formées d'un côté ou de l'autre de la frontière ne peuvent pas la traverser pendant le développement (Fig. 2.42).

Contrairement aux gènes pair-rule et gap, dont l'activité est transitoire, il est nécessaire qu'*engrailed* soit exprimé continuellement pendant toute la vie de la mouche pour maintenir l'identité du compartiment postérieur du segment. De plus, contrairement à d'autres gènes de polarité segmentaire, le patron d'expression d'*engrailed* reste le même pendant tout le développement et est toujours associé à celui de *hedgehog*.



engrailed est un exemple de **gène sélecteur**, c'est-à-dire un gène dont l'activité est nécessaire et suffisante pour entraîner les cellules dans une destinée spécifique. Les gènes sélecteurs peuvent contrôler le développement d'une région, un compartiment par exemple, et en contrôlant l'activité d'autres gènes, donner à cette région une identité particulière.

Les frontières des compartiments, ainsi que l'expression de *engrailed* et de *hedgehog*, sont conservées au sein des disques imaginaux, qui dérivent de segments embryonnaires spécifiques (Fig. 2.6), et dans les structures adultes qui dérivent des disques, comme les ailes et les pattes (Chapitre 11). Comme cela sera abordé plus loin dans ce chapitre, les compartiments sont plus facilement identifiables dans ces structures constituées de milliers de cellules.

Les segments définitifs de l'embryon tardif et de la larve dérivent des parasegments avec la frontière antérieure de chaque segment se formant postérieurement aux dernières cellules exprimant *engrailed*. Ceci signifie que chaque segment est divisé en deux compartiments, un antérieur et un postérieur, l'expression d'*engrailed* définissant le compartiment postérieur (Fig. 2.33).

2.25 Les gènes de polarité segmentaire stabilisent les frontières parasegmentaires

L'établissement des frontières parasegmentaires dépend d'une boucle de signalisation intercellulaire établie entre cellules voisines. Cette boucle délimite la frontière entre ces cellules, ce qui est discuté en détail dans le Section 2.26. En plus d'engrailed, ce circuit implique les gènes de segmentation wingless et hedgehog, qui sont également exprimés dans des domaines restreints à l'intérieur du parasegment en réponse aux protéines pair-rule (Fig. 2.43). Contrairement à engrailed qui code un facteur de transcription, wingless et hedgehog codent des protéines sécrétées, respectivement Wingless et Hedgehog. Celles-ci activent, via des récepteurs membranaires, des voies de signalisation intracellulaires qui modifient l'expression génique. Le gène wingless (« sans ailes ») est nommé ainsi en raison des effets chez la mouche adulte de sa mutation de perte de fonction (Chapitre 11). Le nom hedgehog (« hérisson ») vient du fait que les embryons homozygotes pour une mutation de ce gène sont plus petits que la normale et présentent une face ventrale entièrement couverte de denticules, ce qui les fait ressembler à des hérissons. Wingless est un des membres de la famille de protéines Wnt (Fig. 2.19), des molécules de signalisation clefs du développement des animaux, notamment impliquées dans la formation des lignées cellulaires et la différenciation cellulaire. De même Hedgehog, possède des homologues aux fonctions similaires chez d'autres animaux, comme Sonic hedgehog chez les vertébrés.

Le résultat de l'activité initiale des gènes pair-rule est l'établissement, dans le blastoderme, de bandes de la largeur d'une cellule exprimant *engrailed* et *hedgehog*, délimitant la frontière antérieure de chaque parasegment, et de bandes similaires, postérieure aux premières et exprimant *wingless* (Fig. 2.43). Les cellules exprimant *wingless* et celles exprimant *engrailed* et *hedgehog* sont donc adjacentes de part et d'autre de la frontière du parasegment.

2.26 Des signaux émis à la frontière parasegmentaire délimitent et organisent les futurs segments

Chez l'embryon âgé, l'épithélium qui couvre le thorax et l'abdomen commence à être subdivisé en unités répétées, les futurs segments. Chacun d'eux est constitué d'un compartiment antérieur et d'un compartiment postérieur délimités par les frontières parasegmentaires originelles (Fig. 2.43). Comment les signaux de chaque côté de la frontière des parasegments délimitent-ils et modèlent-ils les parasegments et ainsi les futurs segments ?

Le gène *engrailed* est exprimé dans les cellules le long de la frontière antérieure des parasegments. Ces cellules expriment aussi le gène de polarité segmentaire *hedgehog* et sécrètent la protéine de signalisation Hedgehog. Les cellules adjacentes de chaque côté produisent Patched, le récepteur de Hedgehog, et le gène *patched* lui-même est



correspond à une restriction de lignée cellulaire. Les cellules individuelles sont marquées (en vert) dans le blastoderme, lorsque toutes les cellules sont identiques et que l'embryon est dépourvu de profils d'expression géniques. Les cellules se divisent à mesure que l'embryon se développe et donnent naissance à de petits clones. Lorsque les clones sont cartographiés par rapport à l'expression de engrailed (en jaune), il est possible de visualiser la position des clones par rapport à la limite antérieure de l'expression de enarailed aui correspond à la frontière parasegmentaire. On a trouvé qu'aucun clone ne franchissait cette frontière, indiquant que celle-ci marque une restriction de lignée et délimite un compartiment cellulaire.

D'après Vincent, J.-P., O'Farrell, P.H. : The state of engrailed expression is not clonally transmitted during early Drosophila development. Cell 1992, 68 : 923-931.



Fig. 2.43 Domaines d'expression de certains gènes clés de polarité segmentaire. Schémas du haut : les zones de production des protéines pair-rule Ftz et Eve forment des bandes étroites le long de l'embryon et délimitent les parasegments. Ces protéines activent l'expression des gènes engrailed et hedgehog dans une bande cellulaire de la largeur d'une seule cellule à la bordure antérieure de chaque parasegment, alors que le gène wingless, qui est réprimé par Ftz et Eve, est exprimé dans une bande de la largeur d'une seule cellule dans la partie postérieure du parasegment, là où l'expression des gènes pair-rule s'estompe. Schémas du bas : quand l'embryon se développe, hedgehog est exprimé dans une bande d'une largeur de deux cellules sur le bord antérieur du parasegment, tandis que wingless est exprimée dans une bande d'une cellule immédiatement adjacente de l'autre côté de cette frontière (ligne du haut). À ce moment, l'expression du gène patched, qui code le récepteur de la protéine Hedgehog, est induite par la protéine Hedgehog sécrétée et est donc exprimé de part et d'autre du domaine d'expression engrailed/hedgehog (ligne du bas). Toutes les cellules produisent Frizzled, le récepteur de Wingless (non représenté). Les segments définitifs de l'embryon tardif et de la larve (gris ombré dans les deux lignes) sont décalés par rapport aux parasegments de telle sorte que la frontière du parasegment d'origine délimite maintenant le compartiment postérieur du segment. Ce compartiment postérieur continue à être marqué par l'expression de engrailed pendant toute la vie de la mouche.

une cible de la voie de signalisation Hedgehog (Fig. 2.43). La protéine Hedgehog agissant sur ces cellules déclenche une voie de signalisation intracellulaire qui active et maintient l'expression de *wingless* dans ces cellules. La protéine Wingless est sécrétée et agit en retour sur les cellules exprimant *engrailed* pour stimuler une voie de signalisation qui maintient l'expression de *engrailed* et *hedgehog*. Toutes les cellules expriment Frizzled, le récepteur de Wingless, mais seules celles proches de la source du signal Wingless y sont réceptives. Ces interactions stabilisent et maintiennent la frontière parasegmentaire (Fig. 2.44), et font de cette frontière un **centre de signa-lisation** qui produit des signaux, Hedgehog et Wingless, qui modèlent le segment. Comme indiqué plus haut, la frontière parasegmentaire est la frontière antérieure du compartiment postérieur dans le futur segment. Donc, dans le segment, *engrailed* et *hedgehog* sont exprimés dans le compartiment postérieur, et *wingless* dans les cellules immédiatement antérieures à ce compartiment.

La voie de signalisation de Hedgehog chez la drosophile est illustrée dans l'Encart 2F. Au niveau des frontières parasegmentaires, comme dans d'autres contextes du développement, Wingless et les protéines Wnt des vertébrés agissent *via* une



voie de signalisation conservée, décrite dans l'Encart 4B, et souvent appelée **voie canonique Wnt/β-caténine**. La **β-caténine** est un co-activateur transcriptionnel qui en absence de signalisation par Wingless est dégradé dans le cytoplasme par un complexe protéique. Quand Wingless se fixe sur son récepteur Frizzled, ce complexe protéique cytoplasmique est inhibé et la β-caténine peut alors entrer dans le noyau et activer les gènes cibles de Wingless. La modélisation informatique de la boucle de signalisation Wingless-Hedgehog-Engrailed montre que cette dernière est remarquablement robuste et insensible aux variations, comme celles relatives aux niveaux d'expression des gènes impliqués.

Environ trois heures après que les frontières parasegmentaires se sont formées, un profond sillon se développe au niveau du bord postérieur de chaque bande *engrailed* et celui-ci constitue la frontière antérieure de chaque segment. Un embryon segmenté à un stade tardif est montré dans les Fig. 2.4 (à droite) et Fig. 2.33.

Une fois qu'une frontière parasegmentaire est consolidée, les signaux localisés de chaque côté mettent en place l'organisation de chaque segment, ce qui conduit finalement à la différenciation des cellules de l'épiderme pour former les structures cuticulaires retrouvées chez l'embryon âgé et la larve. Chaque segment chez la jeune larve a une organisation antéro-postérieure parfaitement définie, qui peut-être mieux appréciée au niveau de l'épiderme ventral. La partie antérieure de chaque segment porte des denticules, alors que dans la plupart des segments, la région postérieure en est dépourvue. Les denticules apparaissent aux stades tardifs du développement embryonnaire (Fig. 2.45), et reflètent l'organisation primitive de l'épiderme Fig. 2.44 Les interactions entre les gènes hedgehog, wingless et engrailed et les protéines établissent les limites des parasegments et contrôlent les motifs de denticules. En haut à gauche : le gène de polarité segmentaire hedgehog est exprimé dans les cellules positionnées le long du bord antérieur du parasegment, qui est également délimité par l'expression du gène engrailed. La protéine Hedgehog est sécrétée et son action sur les cellules adiacentes entraîne l'activation et le maintien de l'expression du gène wingless. La protéine Wingless sécrétée agit en retour sur les cellules exprimant engrailed et hedgehog et maintient l'expression de ces gènes. Ces interactions stabilisent et maintiennent la frontière. En haut à droite : chez les mutants où le gène wingless est inactivé et la protéine Wingless absente, ni hedgehog ni engrailed ne sont exprimés. Cela conduit à la perte de la frontière du parasegment et la conversion du segment entier en un segment de type « antérieur ». En bas à gauche : les bandes de denticules sur la cuticule ventrale des segments abdominaux sont des marqueurs utiles des différents segments. Dans la larve de type sauvage, les bandes de denticules sont confinées à la partie antérieure du segment, tandis que la cuticule postérieure est nue. Cette organisation dépend de l'activité des gènes hedgehog et wingless. En bas à droite : dans le mutant wingless, le patron, normalement bien défini, des denticules à l'intérieur de chaque segment abdominal est perdu. Des denticules sont présents sur toute la surface ventrale du segment dans ce qui ressemble à une image en miroir du motif de denticules de la partie antérieure du segment.

Illustration d'après Lawrence, P. : The Making of a Fly. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992.

ENCART 2F La voie de signalisation Hedgehog

En absence de Hedgehog (Figure 1, gauche), la protéine membranaire Patched, le récepteur de Hedgehog, inhibe la protéine membranaire Smoothened. Lorsque Smoothened est inactif, le facteur de transcription Cubitus interruptus (Ci) est maintenu dans le cytoplasme dans deux complexes protéiques, l'un associé à Smoothened et l'autre à la protéine Suppressor of fused (Su(fu)). En absence de Hedgehog, Ci dans le complexe Smoothened est phosphorylé par plusieurs protéines kinases (glycogène synthétase kinase (GSK-3), protéine kinase A (PKA) et caséine kinase 1 (CK1)), ce qui provoque le clivage protéolytique de Ci et la formation de la protéine tronquée CiRep. Cette dernière entre dans le noyau et agit comme un répresseur des gènes cibles de Hedgehog. Quand Hedgehog est présent, il se lie à Patched (Figure 1, droite) et ceci lève l'inhibition de Smoothened et bloque la production de CiRep. Ci est alors libéré du complexe protéique, entre dans le noyau, et active la transcription. Les gènes activés en réponse à la signalisation Hedgehog incluent *wingless (wg), decapentaplegic (dpp)*, et *engrailed (en)*.





Animation de la voie de signalisation Hedgehog



Fig. 2.45 Distribution des denticules d'un embryon tardif de drosophile juste avant l'éclosion. Chaque segment a un motif caractéristique de denticules sur sa surface ventrale. Les denticules sont confinés sur la partie antérieure de chaque segment. Cette vue montre la surface ventrale de l'embryon.

D'après Goodman, R.M., et al. : **Sprinter : a novel transmembrane protein required for Wg** secretion and signalling. Development. 2006, **133 :** 4901-4911.

embryonnaire sous l'action des gènes de polarité segmentaire. Les rangées de denticules forment des motifs différents dans chaque segment et des mutations dans les gènes de segmentation altèrent ces motifs de manière systématique : c'est de cette façon que ces gènes ont été initialement découverts (Encart 2G).

Les différents motifs des ceintures de denticules sont spécifiés par les signaux générés par Wingless et Hedgehog. À ce stade tardif du développement embryonnaire, les productions de Hedgehog et Wingless ne dépendent plus l'une de l'autre et peuvent être analysées séparément. La protéine Wingless diffuse postérieurement en traversant la frontière parasegmentaire, et aussi antérieurement pour modeler la partie du segment immédiatement antérieure aux cellules qui l'expriment. La diffusion de Wingless est plus limitée postérieurement qu'antérieurement, car la protéine est plus rapidement dégradée dans la partie postérieure du segment. L'amplitude des effets de Wingless est donc plus importante dans la région antérieure.

Wingless réprime les gènes nécessaires à la formation des denticules. En conséquence, les cellules immédiatement antérieures à la ligne cellulaire exprimant *wingless* deviennent des cellules épidermiques produisant de la cuticule lisse et la signalisation Wingless délimite le bord postérieur des ceintures de denticules de chaque segment. Chez les mutants dépourvus de fonction du gène *wingless*, des denticules se forment dans la région normalement lisse (Fig. 2.44).

Les signaux Hedgehog diffusent antérieurement, ce qui maintient Wingless actif, et aussi plus postérieurement, participant ainsi à la formation de la partie antérieure du segment suivant. Les signaux générés par Hedgehog et Wingless conduisent chez l'embryon tardif, *via* des interactions multiples, à la formation de fines bandes d'expression géniques distinctes. Ces gènes spécifient le caractère lisse de la cuticule ou les différents motifs denticulaires (Fig. 2.46).

2.27 Les compartiments perdurent chez la mouche adulte

Les compartiments segmentaires sont reproduits dans les disques imaginaux qui proviennent de certains segments (Fig. 2.6), et dans les structures adultes, comme les ailes et les pattes, qui dérivent des disques imaginaux (abordé au Chapitre 11).

L'illustration la plus claire de la restriction clonale à l'intérieur des compartiments est fournie par les ailes de la mouche adulte. Il est plus facile de distinguer des restrictions clonales dans les structures adultes que chez l'embryon ou la jeune larve, en raison des très nombreuses divisions cellulaires qui ont eu lieu depuis la mise en place initiale des compartiments chez l'embryon. Des techniques comme celles décrites dans l'Encart 2H, permettent de montrer que, dans l'aile normale, la frontière des compartiments est extrêmement nette et rectiligne, et ne correspond à aucune caractéristique structurale de l'aile (Fig. 2.47).

Les compartiments ont été caractérisés initialement par construction de mouches génétiquement mosaïques, constituées de deux types de cellules parfaitement distinguables (Encart 2H). Pratiquement, on donne à des cellules du blastoderme embryonnaire ou de l'épiderme de la larve un phénotype identifiable par recombinaison mitotique induite par rayons X ou faisceau laser. Le devenir des descendants de ces cellules marquées est ensuite suivi. Leur comportement dépend du stade de développement pendant lequel le noyau fondateur a été marqué. Les descendants des noyaux marqués à des stades précoces se retrouvent dans différents tissus et organes, mais les descendants des noyaux marqués au stade blastoderme ou à des stades ultérieurs ont une destinée plus restreinte. Ils sont trouvés uniquement dans la partie antérieure ou postérieure de chaque segment (ou d'un appendice comme l'aile), jamais dans tout le segment.

Les cellules des disques imaginaux se divisent une dizaine de fois seulement après le stade blastoderme cellulaire. Les clones des cellules expérimentalement marquées sont donc relativement petits, même chez l'adulte, et il est difficile de déceler les limites de restriction clonale (Fig. 2.47, en haut). La taille des clones peut être augmentée par la technique *Minute*, qui consiste à marquer et détecter les cellules qui présentent un rythme de division plus élevé que les autres (Encart 2H). Un clone unique de telles cellules peut presque remplir la partie antérieure ou la partie postérieure de

ENCART 2G Les mutants affectant l'organisation des denticules donnent des informations sur l'organisation des segments

Les mutations qui affectent les denticules ont été découvertes bien avant qu'on ne s'intéresse aux voies de signalisation responsables de la formation des segments. Bien qu'en théorie, les patrons de denticules puissent être altérés de différentes façons, les mutations ne conduisent qu'à trois classes possibles de phénotypes (Figure 1). Avec ce nombre limité de classes, et donc de phénotypes mutés, une logique de construction de l'épiderme semblait opérer, sous l'influence de gènes fonctionnellement liés. On sait aujourd'hui que c'est effectivement le cas.

L'une des classes phénotypiques est liée à la perte de fonction du gène *wingless* (Fig. 2.44). Chez ces mutants, la partie antérieure de chaque segment a été dupliquée en miroir, et l'organisation habituelle de la région postérieure fait défaut. Il y a beaucoup de mutants présentant ce phénotype et tous sont liés à des gènes codant des éléments de la voie Wnt. Par exemple, la mutation *hedgehog* fait partie de cette classe, puisqu'en absence de signalisation par Hedgehog, l'expression de *wingless* est absente.

Une deuxième classe de phénotypes est illustrée par la perte de fonction d'un gène appelé *axin*, qui code pour un élément de la voie de signalisation intracellulaire de Wingless. Elle conduit à une transformation diamétralement opposée à celle de la mutation *wingless*, à savoir que la partie antérieure de chaque segment est transformée en région de type postérieur, et les denticules sont remplacés par une cuticule lisse. La protéine Axine est un régulateur négatif de la voie de signalisation intracellulaire qui maintient la β -caténine à l'état inactif en l'absence d'activation de la voie Wingless (Encart 4B). Ainsi, sa perte de fonction place la β -caténine dans un état actif permanent. D'autres mutations de régulateurs de cette voie produisent le même phénotype, qui survient également quand *wingless* est exprimé de façon homogène dans l'embryon.

La troisième classe de phénotypes est illustrée par des mutations de *patched*, qui code un récepteur de Hedgehog. Des pertes de fonctions de *patched* ont ainsi un effet négatif sur la signalisation de Hedgehog. Des mutations touchant d'autres éléments de la voie de Hedgehog ont un phénotype similaire. Ces trois classes de mutants ont permis d'identifier Wingless et Hedgehog comme les régulateurs principaux des effets observés. Ils ont permis d'identifier les acteurs moléculaires des voies de signalisation impliquées et l'ordre dans lequel ces acteurs interviennent dans ces voies.





Fig. 2.46 La formation des segments confine la production de denticules au niveau

de cellules spécifiques. Après la gastrulation, la diffusion de Wingless et Hedgehog couvre l'ensemble du segment. Au fur et à mesure que l'embryon grandit, des domaines cellulaires à l'intérieur de chaque segment sortent de l'influence de Hedgehog et Wingless et les gènes qui sont réprimés par ces voies de signalisation peuvent alors être exprimés. Un de ces gènes code la protéine Serrate (Ser), qui est un ligand de Notch. Serrate envoie alors un signal aux cellules adjacentes qui conduit à l'activation de l'expression du gène rhomboïd, qui code une protéine impliquée dans la régulation de la signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique et qui est nécessaire à la formation de denticules. Au même moment, la diffusion de Wingless devient polarisée, et seules les cellules antérieures à son domaine d'expression sont exposées à son action. Cette séquence d'interactions et d'expressions géniques crée un paysage moléculaire complexe, qui se traduit par une fine structuration du segment. Wingless supprime la production de denticules au niveau de cellules produisant la cuticule lisse, alors que dans le reste du segment, la finesse du profil d'expression génique généré à mesure que l'embryon croît et mûrit, résulte en l'émergence de différents types de denticules sur chaque rangée de cellules. Le motif denticulaire du deuxième segment abdominal est représenté ici. engrailed continue à être exprimé dans les cellules exprimant hedgehog (non représenté pour plus de simplicité).

Illustration d'après Lawrence, P. : The Making of a Fly. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992.

l'aile, rendant la limite clonale beaucoup plus nette : elle correspond en fait à la limite entre les compartiments antérieur et postérieur (Fig. 2.47, au milieu). Ces expériences montrent également que l'organisation topographique de l'aile ne dépend en aucune manière du type de lignage cellulaire. Une cellule embryonnaire marquée peut fournir le vingtième du total des cellules de l'aile adulte, et avec la technique *Minute*, à peu près la moitié de l'aile. Le lignage des cellules de l'aile dans chaque cas est complétement différent, cependant l'organisation de l'aile est normale. Cela signifie que les

ENCART 2H Mosaïques génétiques et recombinaison mitotique

Les mosaïques génétiques sont des embryons dérivés d'un génome unique mais chez lesquels on trouve un mélange de cellules dont certains gènes ont été modifiés ou inactivés. Chez les mouches, les mosaïques génétiques peuvent être générées en induisant des événements rares de recombinaison pendant les mitoses des cellules somatiques de l'embryon ou de la larve. La méthode originelle consistait à induire des cassures chromosomiques avec des rayons X au moment où les chromosomes sont formés de deux chromatides après réplication. Ce traitement produit un échange de matériel entre les chromosomes homologues au moment où les cassures chromosomiques sont réparées. Aujourd'hui la recombinaison mitotique est induite dans des lignées de mouches transgéniques qui portent sur leurs chromosomes le gène codant la recombinase de levure FLP et plusieurs exemplaires de sa séquence cible FRT. L'activité de la recombinase conduit à des recombinaisons entre les séquences FRT. Un événement de recombinaison mitotique peut générer une cellule possédant une constitution génétique unique qui sera transmise à toutes ses descendantes qui forment en général une région cellulaire bien circonscrite (Figure 1).

Des mutations récessives avec des phénotypes facilement distinguables, comme multiple wing hairs (multiples « poils » d'aile), peuvent être utilisées pour identifier le clone cellulaire marqué. Si une cellule homozygote pour cette mutation est générée par recombinaison dans une larve hétérozygote, toutes ses descendantes auront de multiples « poils » sur l'aile (Figure 1). Les clones épidermiques marqués par cette méthode sont en général petits car il y a peu de prolifération cellulaire après un événement de recombinaison. Des clones plus volumineux peuvent être obtenus en utilisant la technique Minute. Les cellules des mouches portant une mutation dans le gène Minute poussent plus lentement que les cellules sauvages. En utilisant des mouches hétérozygotes pour la mutation *Minute*, des clones



Figure 1

Illustration after Lawrence, P.: The Making of a Fly. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992.

peuvent être réalisés dans lesquels la recombinaison mitotique a produit une cellule marquée normale car ayant perdu la mutation *Minute*. Cette cellule prolifère plus vite que celles qui l'environnent et ainsi de larges clones de cellules marquées sont produits (Fig. 2.47). La technique de recombinaison mitotique a de multiples applications. Si les clones de cellules marquées sont générés

à différents stades du développement, on peut suivre le destin des cellules modifiées et donc repérer les structures auxquelles elles contribuent. Cela peut fournir des informations sur leur degré de détermination ou de spécification à différents stades du développement. La technique peut aussi être utilisée pour étudier les effets de mutations qui sont létales si elles sont présentes à l'état homozygote dans toutes les cellules de l'animal.
assemblages cellulaires se font à partir de groupes de cellules, plutôt qu'à partir de cellules individuelles. Nous verrons au Chapitre 6, une situation totalement différente chez le nématode *C. elegans*, chez lequel les lignées cellulaires sont constantes dans le développement, et l'assemblage cellulaire se fait à partir de cellules ayant une identité unique.

La spécification des cellules appartenant au compartiment postérieur d'un segment (la partie antérieure du parasegment) survient initialement quand les parasegments sont mis en place, et ceci grâce au gène *engrailed*. L'expression d'*engrailed* est nécessaire à la fois pour donner une identité de type « segment postérieur » aux cellules, et pour changer leurs propriétés de surface de sorte qu'elles ne peuvent pas se mélanger à des cellules qui leur sont adjacentes, ce qui forme la frontière parasegmentaire. Ce rôle d'*engrailed* a été démontré grâce au comportement de clones de cellules de l'aile chez les mutants *engrailed* (Fig. 2.47, en bas). En l'absence d'expression normale d'*engrailed*, les clones ne sont pas confinés dans les parties antérieures ou postérieures du segment, et il n'y a pas de frontières de compartiments. De plus, chez ces mutants, le compartiment postérieur est en partie transformé de sorte que son organisation ressemble à celle de la partie antérieure de l'aile. Par exemple, les « poils » normalement localisées sur la marge antérieure de l'aile, sont aussi observées sur la bordure postérieure.

2.28 Les cellules épidermiques des insectes deviennent polarisées individuellement suivant une direction antéro-postérieure dans le plan de l'épithélium

L'organisation des denticules de la larve reflète l'organisation des segments et illustre aussi un autre aspect du développement de la drosophile, qui existe chez tous les animaux. Il s'agit du phénomène de **polarité planaire**, au cours duquel les cellules acquièrent une orientation, dans le sens que leurs extrémités sont structurellement et biochimiquement différentes l'une de l'autre. Ce type de polarité cellulaire est dite planaire car la polarisation s'effectue dans le plan du tissu, contrairement à la polarité apico-basale des cellules épithéliales qui, elle, est perpendiculaire au plan du tissu (la polarité planaire chez la drosophile et les vertébrés est décrite plus en détail dans le Chapitre 9). La polarité planaire est bien plus facile à observer dans les épithéliums, comme l'épiderme, car dans ces tissus toutes les cellules sont polarisées suivant la même orientation.

Dans le cas de la cuticule larvaire, la polarité planaire est évidente car les denticules des rangées pointent dans des directions précises reflétant la polarité des cellules épidermiques qui les ont formés. Il est probable que les images en miroir des motifs de denticules observées chez les mutants *wingless* et *patched* (Fig. 2.44 et Encart 2G) reflètent des effets indirects de la perte de fonction de ces gènes sur la polarité planaire.

De nombreux types différents de cellules présentent une polarité planaire. Par exemple, les cellules subissant une chimiotaxie en réponse à un gradient d'un facteur chimiotactique. Le front de migration de la cellule est tout à fait différent de son extrémité postérieure. Les soies de l'épiderme abdominal de la drosophile adulte pointent toutes dans une direction postérieure, ce qui indique là aussi la polarisation planaire de l'épiderme. C'est également le cas dans l'aile de drosophile : les cellules épidermiques de la face supérieure de l'aile portent des « poils » qui pointent tous dans la même direction (Fig. 2.47). Autre exemple, l'œil composé des insectes est constitué d'unités individuelles (les ommatidies) qui dans chaque moitié de l'œil s'orientent dans une direction opposée à la ligne médiane (discuté dans le Chapitre 11). Cette organisation est le résultat de la mise en place de la polarité planaire des cellules photoréceptrices en développement dans le disque imaginal d'œil. Chez les vertébrés, la polarité planaire est illustrée par les stéréocils de l'oreille interne ou encore par les écailles des poissons. La polarité planaire est également importante pour orienter les mouvements cellulaires morphogénétiques, tels que l'extension de tissus, la chorde par exemple, au cours de la gastrulation et le développement des membres (Chapitres 9 et 11).

Les hypothèses actuelles concernant les mécanismes responsables de la mise en place de la polarité planaire proposent l'existence d'un gradient d'informations parcourant



Fig. 2.47 La limite entre les compartiments antérieur et postérieur de l'aile de la drosophile peut être mise en évidence grâce à des clones cellulaires génétiquement marqués. En haut : dans l'aile sauvage, les clones marqués par recombinaison mitotique dans l'embryon, qui donne aux cellules marquées un phénotype différent des autres cellules de l'aile, sont trop petits pour révéler la limite du compartiment. Au centre : l'utilisation de la technique Minute (Encart 2H) produit un taux supérieur de division de la cellule marquée et donne des clones suffisamment grands pour savoir si les cellules d'un compartiment traversent ou non la frontière avec un compartiment adjacent. En bas : dans l'aile d'un mutant *engrailed* qui n'exprime pas la protéine Engrailed, il n'y a pas de compartiment ou de limite postérieure. Les clones de la partie antérieure de l'aile pénètrent dans la région postérieure et la région postérieure est transformée en une structure plus antérieure portant sur son bord des « poils » de type antérieur. Comme il est décrit précédemment, le gène engrailed est nécessaire pour le maintien de l'identité du compartiment postérieur et pour la formation de la frontière.

ENCART 21 Polarité planaire chez la drosophile

Les cellules d'un épithélium ont une polarité apico-basale et une polarité planaire. Cette dernière, ou polarité dans le plan de l'épithélium, a un rôle particulier dans l'organisation embryonnaire pendant le développement. Elle est visible au niveau de l'épiderme de la mouche adulte, l'épiderme abdominal notamment, avec ses « poils » tous orientés postérieurement (Figure 1, a), et l'épiderme alaire avec ses « poils » tous orientés vers l'extrémité distale de l'aile.



Figure 1

Le mécanisme de mise en place de la polarité planaire n'est pas très bien compris, particulièrement en ce qui détermine les axes de polarité dans le tissu. À l'échelle cellulaire cependant, des protéines clefs ont été caractérisées. Le récepteur membranaire Frizzled (Fz) est l'une d'entre elles. Dans l'épiderme abdominal de la mouche, si Fz est absente, la polarité tissulaire est perturbée et les « poils » prennent des orientations aléatoires (Figure 1, b). Mais si le gène codant Fz est inhibé seulement dans une petite population clonale de cellules épidermiques, les cellules non affectées immédiatement postérieures au clone présentent une polarité inversée, ce qui montre que la polarité dépend d'une communication intercellulaire globale (Figure 1, c ; les flèches rouges indiquent l'inversion de direction ; les flèches noires, la polarité normale antéro(A)-postérieure(P)). Fz présenté précédemment comme le récepteur de Wingless, n'agit pas dans le cas de la polarité planaire, via la voie canonique de Wnt (Encart 4B), et n'est probablement pas stimulé par des protéines Wnt.

On pense que Fz a au moins trois fonctions dans la polarité planaire. La première est de recevoir des informations de molécules situées en amont dans la voie de signalisation et agissant à longue distance ; cette fonction impliquerait un gradient d'activité Fz dans l'ensemble du tissu. Des expériences de repolarisation clonale comme celle illustrée dans la figure suggèrent qu'il y a une polarisation orientée vers les concentrations basses du gradient d'activité de Fz. Les cellules pointent systématiquement leurs « poils » dans la direction des faibles concentrations de Fz. Fz est également impliqué dans la communication intercellulaire qui coordonne localement la polarité cellulaire. La troisième fonction de Fz est de favoriser la croissance des « poils ».

Il est maintenant clair que des interactions clefs qui déterminent et stabilisent la polarité de cellules individuelles se mettent en place au niveau des jonctions entre cellules épidermiques. L'asymétrie entre les deux côtés d'une jonction est due aux interactions entre protéines des membranes des cellules adjacentes. Concernant la polarité de l'aile par exemple, Fz s'associe avec une cadhérine atypique, Flamingo (Fmi, appelée aussi Starry Night) à l'extrémité distale de chaque cellule épidermique, alors qu'au niveau proximal, Fmi est associée à la protéine membranaire Van Gogh (Vang, appelée aussi Strabismus). Une interaction jonctionnelle asymétrique entre les complexes Fz/Fmi et Fmi/Vang semble être centrale pour établir la polarité cellulaire, par un mécanisme qui reste cependant à préciser. Les protéines de signalisation cytoplasmiques Dishvelled (Dsh) et Diego (Dgo) vont s'associer à Fz/Fmi et la protéine cytoplasmique Prickled (Pk) à Fmi/Vang (Figure 2). Ces protéines cytoplasmiques ne semblent pas essentielles pour l'établissement de la polarité en elle-même, mais pourraient aider la polarité à se matérialiser dans la cellule.

Un autre groupe encore de protéines qui inclut la protéine membranaire Four-jointed et les cadhérines atypiques Dachsous et Fat a aussi été impliqué dans la détermination de la polarité planaire. Ces protéines forment des gradients de signalisation de longue portée le long des axes de polarité dans les tissus, et leurs interactions avec les protéines citées ci-dessus pourraient fixer l'orientation de la polarité.

Cependant, il est prouvé que ces protéines peuvent opérer indépendamment en parallèle avec le système Fz-Fmi-Vang plutôt que d'une façon strictement corrélée. Un clone cellulaire surproduisant Dachsous ou d'autres protéines de ce groupe, peut repolariser des cellules adjacentes même si celles-ci n'ont plus de Fz et de Fmi et ne peuvent donc plus former de complexes jonctionnels. Les mécanismes de la polarité cellulaire ne sont cependant pas totalement éclaircis et constituent encore aujourd'hui un domaine d'investigation fascinant.

L'établissement de la polarité cellulaire est un aspect important du développement chez tous les animaux. Il sera vu au Chapitre 9, par exemple, comment certaines des protéines qui viennent d'être citées régulent les changements de la forme et de la polarité cellulaire, ce qui favorise le remodelage des embryons des vertébrés pendant la gastrulation.







Fig. 2.48 Des gradients pourraient spécifier la polarité des segments d'Oncopeltus. Les « poils » de la cuticule pointent dans une direction postérieure et ceci peut refléter l'action sous-jacente d'un gradient d'un morphogène maintenu en partie par la frontière segmentaire (schémas de gauche). Lorsqu'il y a une rupture de

cette frontière (schémas de droite), la discontinuité marquée dans la concentration de morphogène est lissée, avec pour résultat un retournement local du gradient et de la direction dans laquelle les « poils » pointent. Ce phénomène est illustré par la photo à droite.

le tissu entier et fixant sa polarité globale. En revanche, la mise en place de la polarité à l'échelle cellulaire relèverait plutôt de la signalisation entre deux cellules voisines (Encart 2I). Dans le cas de l'épiderme abdominal chez l'insecte, les gradients de signalisation mis en place au niveau des frontières des compartiments auraient un rôle dans l'établissement de la polarité planaire, en plus de leur fonction dans l'organisation du segment.

Une altération naturelle de la polarité planaire peut être observée chez les adultes du petit insecte herbivore Oncopeltus, qui comme la drosophile, possède sur chaque segment des « poils » qui sont tous orientés dans la direction postérieure (Fig. 2.48, à gauche). Chez Oncopeltus, certains individus présentent une discontinuité de la frontière segmentaire qui génère localement un patron assez régulier de « poils » présentant une orientation inverse de celle des poils habituels (voir Fig. 2.48, au centre et à droite). Si la pente d'un gradient de concentration à l'intérieur de chaque segment est à l'origine de la polarité des « poils », une discontinuité de la frontière segmentaire changerait le gradient localement, celui-ci devenant moins abrupt et même inversé. Cette situation serait responsable de l'inversion de la polarité des « poils ». Des mutations responsables d'inversions de polarité similaires peuvent être induites dans des clones cellulaires dans l'épiderme abdominal de la drosophile, et leurs effets peuvent aussi être expliqués par la perturbation d'un gradient informationnel mis en place dans un compartiment. Des gènes essentiels pour la polarité planaire ont été identifiés chez la drosophile et d'autres organismes. C'est le cas aussi de certaines protéines qui sont impliquées dans la mise en place du gradient à longue portée et dans les voies de signalisation qui peuvent interpréter ce gradient de façon à établir la polarité cellulaire (Encart 21).

RÉSUMÉ

Les gènes de polarité segmentaire sont impliqués dans l'organisation des parasegments embryonnaires et segments larvaires. Les principaux gènes dans ce processus sont *wingless* et *hedgehog*, qui codent des molécules de signalisation cellulaire majeures régulant mutuellement leur expression. L'activité des gènes gap et pair-rule restreint l'activité des protéines Wingless et Hedgehog aux versants postérieur (Wingless) et antérieur (Hedgehog) des frontières parasegmentaires, ce qui génère une source d'informations organisatrices. Un autre gène activé au même moment est engrailed, exprimé dans les mêmes cellules que hedgehog. La drosophile présente un développement de type « à bandelette germinative longue » dans lequel tous les segments sont spécifiés au même stade du développement. D'autres insectes au contraire ont un développement de type « à bandelette germinative courte » dans lequel les segments postérieurs sont ajoutés par un processus de croissance après le stade blastoderme cellulaire. Des régions de restriction clonale, appelées compartiments, ont été initialement observées chez la drosophile. La frontière parasegmentaire constitue une limite de compartiment qui devient la frontière séparant les parties antérieure et postérieure d'un segment chez la larve et l'adulte. Les protéines Engrailed et Hedgehog (mais pas Wingless) continuent à être exprimées chez l'adulte où elles jouent aussi un rôle organisateur. L'épiderme de la drosophile présente également une polarité planaire, laquelle attribue une orientation particulière à un tissu et représente une caractéristique universelle du développement animal. La polarité planaire est facilement observable chez l'adulte : elle est révélée par l'orientation unidirectionnelle des « poils » du corps et des ailes.

RÉSUMÉ : l'expression génique et la signalisation intercellulaire structurent les compartiments segmentaires



Spécification de l'identité segmentaire

Chaque segment possède une identité propre caractérisée chez la larve par l'organisation des denticules de la face ventrale. Les mêmes gènes de polarité segmentaire étant activés dans tous les segments, qu'est-ce qui permet aux segments d'être différents les uns des autres ? Leur identité est spécifiée par un groupe de gènes nommés gènes sélecteurs homéotiques qui fixent les futures caractéristiques de chaque segment. Un gène sélecteur est un gène qui, tel *engrailed*, contrôle l'activité d'autres gènes et est nécessaire tout au long du développement pour maintenir ce patron d'expression génique. Des gènes homologues des gènes sélecteurs homéotiques de la drosophile contrôlant l'identité segmentaire ont été découverts par la suite chez tous les animaux. Ceux-ci contrôlent l'identité de chaque portion de l'axe antéro-postérieur, comme cela sera vu chez les vertébrés au Chapitre 5.



Fig. 2.49 Les complexes de gènes sélecteurs homéotiques Antennapedia et bithorax. L'ordre des gènes de 3 'à 5' dans chaque complexe de gènes reflète à la fois l'ordre de leur expression aux niveaux spatial (antérieure à postérieure) et temporel (les gènes en 3' sont exprimés d'abord).

2.29 Les gènes Hox spécifient l'identité des segments chez la drosophile

Les premiers indices de l'existence de gènes spécifiant l'identité segmentaire ont été fournis par des mutations inhabituelles et étonnantes produisant des transformations homéotiques, à savoir la conversion d'un segment en un autre. Les gènes concernés par ces mutations ont été identifiés, et leur façon intriquée de spécifier l'identité des segments fut révélée. La découverte de ces gènes, appelés gènes Hox, a eu un énorme impact sur la biologie du développement. Des gènes homologues agissant de la même façon sur la spécification de l'identité segmentaire le long de l'axe antéro-postérieur, furent découverts chez d'autres animaux. Les gènes Hox sont aujourd'hui considérés comme une des caractéristiques définissant les animaux. En 1995, le généticien Américain Edward Lewis partagea le prix Nobel de Physiologie et Médecine pour ce travail précurseur sur les complexes de gènes homéotiques chez la drosophile et leur mode de fonctionnement. Chez la drosophile, les gènes Hox sont organisés en deux groupes ou complexes géniques qui collectivement forment le complexe HOX, encore appelé ici HOM-C (Fig. 2.49 et Encart 5E). Les gènes Hox codent tous des facteurs de transcription et tirent leur nom de la partie de leur séquence en ADN, appelée homéoboîte, qui code le domaine de fixation à l'ADN, ou homéodomaine, de ces protéines.

Les deux complexes homéotiques chez la drosophile sont les **complexes bithorax** et **Antennapedia**, nommés ainsi en référence aux mutations qui ont révélé leur existence. Les drosophiles présentant la mutation *bithorax* ont une partie des haltères, des organes d'équilibration présents sur le troisième segment thoracique, transformée en aile (Fig. 2.50), tandis que les mouches avec la mutation dominante *Antennapedia* ont leurs antennes transformées en pattes. Les gènes identifiés grâce à ces mutations sont appelés gènes homéotiques car lorsqu'ils sont mutés, ils produisent une

Fig. 2.50 Transformation homéotique des ailes et des haltères suite à des mutations dans le complexe bithorax. En haut : chez l'adulte normal, les ailes et les haltères sont divisés en compartiment antérieur (A) et postérieur (P). Au centre : la mutation *bithorax* transforme le compartiment antérieur de l'haltère en un compartiment antérieur d'aile. La mutation *postbithorax* agit de façon similaire sur le compartiment postérieur, en le convertissant en compartiment postérieur d'aile (voir Fig. 11.44). En bas : si les deux mutations sont présentes ensemble, l'effet est additif et l'haltère est complètement transformé en aile, produisant une mouche à quatre ailes.

Illustration d'après Lawrence, P. : The Making of a Fly. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992. Photographie reproduite avec l'autorisation de Bender, W., et al. : **Molecular genetics** of the bithorax complex in Drosophila melanogaster. Science 1983, 221 : 23-29 (image de couverture).









homéose, c'est-à-dire la transformation d'une structure ou d'un segment entier en un autre, comme la transformation d'une antenne en patte. Ces transformations étranges sont dues au rôle clef des gènes homéotiques dans la spécification identitaire. Ils contrôlent l'activité d'autres gènes dans les segments, déterminant ainsi par exemple, qu'un disque imaginal formera une aile, ou bien un haltère. Le complexe homéotique bithorax contrôle le développement des parasegments 5 à 14, tandis que le complexe Antennapedia contrôle l'identité de parasegments plus antérieurs. L'action du complexe bithorax est la mieux comprise et sera décrite en première.

2.30 Les gènes sélecteurs homéotiques du complexe bithorax sont responsables de la diversification des segments postérieurs

Le complexe bithorax chez la drosophile comprend trois **gènes à homéoboîte**, *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*), et *Abdominal-B* (*Abd-B*). Ces gènes sont exprimés dans les parasegments de façon combinatoire (Fig. 2.51, premier schéma en haut). *Ubx* est exprimé dans les parasegments 5 à 12, *abd-A* est exprimé plus postérieurement dans les parasegments 7 à 13, et *Abd-B* encore plus postérieurement à partir du parasegment 10. Comme ces gènes sont actifs à des degrés divers dans différents parasegments, leur activité combinée définit les caractéristiques de chaque parasegment. *Abd-B* inhibe également *Ubx*, de sorte que l'expression d'*Ubx* est très faible à partir du parasegment 14 où l'expression d'*Abd-B* commence à être forte. Le patron d'activité des gènes du complexe bithorax est déterminé par les gènes gap et pair-rule.

Le rôle du complexe bithorax a été révélé par des expériences classiques de génétique. Chez les larves sans complexe bithorax (Fig. 2.51, second schéma), les parasegments 5 à 13 se développent tous de la même manière et ressemblent au parasegment 4. Le complexe bithorax est donc essentiel à la diversification de ces parasegments dont la nature originelle est le parasegment 4. Ce dernier peut être ainsi considéré comme le parasegment par défaut et tous les parasegments postérieurs en sont une version modifiée par les protéines codées par le complexe bithorax. C'est précisément pour cette raison que les gènes du complexe bithorax sont appelés gènes sélecteurs : ils sont capables de donner une nouvelle identité au parasegment par défaut.

Une façon de comprendre le rôle de chaque gène du complexe bithorax chez les embryons qui en sont dépourvus est de rajouter un à un les gènes de ce complexe chez ces embryons (Fig. 2.51, troisième à cinquième schémas). Si seul le gène *Ubx* est présent, la larve produite possède les parasegments 4 et 5 et huit parasegments 6. Manifestement, *Ubx* a un effet en arrière du parasegment 5 et peut spécifier les segments 5 et 6. Si *Abd-A* et *Ubx* sont ré-exprimés dans l'embryon, la larve présente alors les parasegments 4 à 8 suivis par cinq parasegments 9. Donc, *Abd-A* affecte les parasegments en arrière du parasegment 7, et combinés, *Ubx* et *Abd-A* peuvent spécifier les caractéristiques des parasegments 7 à 9. La même logique s'applique à *Abd-B*, dont le domaine d'influence s'étend en arrière du parasegment 10 et est le plus fortement exprimé dans le parasegment 14. Des différences entre des segments individuels pourraient refléter des différences spatiales et temporelles de l'expression des gènes Hox.

Fig. 2.51 Le profil d'expression des gènes du complexe bithorax caractérise chaque

parasegment. Dans l'embryon de type sauvage (premier schéma), l'expression des gènes *Ultrabithorax, abdominal-A* et *Abdominal-B* est nécessaire pour conférer une identité à chaque parasegment. Les mutations dans le complexe bithorax entraînent des transformations homéotiques des parasegments et des segments dérivés de ceux-ci. Lorsque le complexe bithorax est complètement absent (deuxième schéma), les parasegments 5-13 sont convertis en neuf parasegments 4 (correspondant au segment T2 dans la larve), comme le montrent les motifs des denticules et des « poils » sur la cuticule. Les trois schémas suivants inférieurs montrent les transformations provoquées par l'absence de différentes combinaisons de gènes. Lorsque seul le gène *Ultrabithorax* est absent (cinquième schéma), les parasegments 5 et 6 sont convertis en 4. Dans chaque cas, le profil d'expression du gène est détecté par hybridation *in situ* (Encart 1D). On notera que la spécification du segment 14 est relativement peu affectée par le complexe bithorax.

Ces résultats illustrent un principe important, celui qui veut que le caractère des parasegments soit spécifié par les gènes du complexe bithorax agissant de façon combinatoire. Cet effet peut aussi être observé en inactivant un à un les gènes du complexe de la mouche sauvage. En absence de Ubx, par exemple, les parasegments 5 et 6 sont convertis en parasegment 4 (Fig. 2.51, schéma du bas). Un effet supplémentaire est observé concernant les motifs de la cuticule des parasegments 7-14 avec l'apparition de structures caractéristiques du thorax au niveau de l'abdomen, indiquant que Ubx exerce un effet sur tous ces segments. De telles anomalies semblent provenir de l'expression de combinaisons « non-sens » des gènes bithorax. Dans un mutant de ce type par exemple, la protéine abd-A est présente dans les parasegments 7-9 en l'absence de la protéine Ubx, ce qui reflète une configuration jamais observée normalement. La place des appendices, comme les pattes, est déterminée par les gènes Hox. Ainsi par exemple, l'expression des gènes Antp et Ubx spécifient les segments à partir desquels les deuxième et troisième paires de pattes vont respectivement émerger. Les gènes cibles dont l'expression est affectée par les protéines Hox commencent à être identifiés, et il semble qu'ils soient très nombreux.

Bien que les protéines gap et pair-rule contrôlent initialement le patron d'expression des gènes Hox, ces protéines disparaissent au bout de 4 heures. La permanence de l'expression normale des gènes Hox implique deux groupes de gènes, les groupes Polycomb et Trithorax. Les protéines du groupe Polycomb maintiennent une répression de la transcription des gènes Hox dans les cellules où ils sont initialement non transcrits, alors que les protéines du groupe Trithorax maintiennent l'expression des gènes Hox dans les cellules où ces derniers sont exprimés.

2.31 Le complexe Antennapedia contrôle la spécification des régions antérieures

Le complexe Antennapedia comprend cinq gènes à homéoboîte (Fig. 2.49), qui contrôlent le développement des parasegments antérieurs jusqu'au parasegment 5, d'une manière similaire au complexe bithorax. Étant donné qu'il n'y a pas de principes fondamentalement nouveaux dans ce cas, son rôle ne sera mentionné que brièvement. Plusieurs gènes dans ce complexe sont impliqués dans la spécification de certains parasegments spécifiques. Des mutations du gène *Deformed* affectent ainsi des structures ectodermiques dérivées des parasegments 0 et 1, et celles du gène *Sex combs reduced*, les parasegments 4 et 5, ceux qui génèrent des disques imaginaux de pattes. Les mutations de *Antennapedia* qui transforment les antennes en pattes chez la mouche adulte s'accompagnent d'une expression atypique du gène *Antp* dans les segments antérieurs.

2.32 L'ordre d'expression des gènes Hox correspond à leur ordre sur le chromosome

Les complexes bithorax et Antennapedia présentent des caractéristiques étonnantes sur le plan de leur organisation. L'ordre des gènes dans ces complexes est le même que l'ordre spatial et temporel dans lequel ces gènes sont exprimés le long de l'axe anté-ro-postérieur pendant le développement. *Ubx* par exemple, qui est situé en position 3' de *abd-A* sur le chromosome, est aussi exprimé plus antérieurement que *abd-A*, et est activé plus précocement. Les complexes Hox des vertébrés, qui ont divergé de ceux des arthropodes il y a plusieurs centaines de millions d'années, montrent la même correspondance entre leurs positions respectives sur les chromosomes et le moment et l'endroit de leur expression (voir Chapitre 14). Cette **colinéarité** spatiale et temporelle est liée aux mécanismes qui contrôlent l'expression de ces gènes.

L'expression des gènes du complexe bithorax est contrôlée très finement comme le révèlent des expériences dans lesquelles la production de la protéine Ubx est induite dans tous les segments. Cette expression anormale a été réalisée en liant la partie codante de *Ubx* à un promoteur de choc thermique activé à partir de 29 °C et en introduisant l'ADN ainsi construit dans le génome de la mouche en utilisant l'élément P (Encart 2D). Lorsqu'un choc thermique est appliqué pendant quelques minutes à cet embryon transgénique de ce type, le gène *Ubx* contenu dans le transgène est transcrit, et la protéine synthétisée en grande quantité dans toutes les cellules. Ceci ne produit aucun effet dans les parasegments postérieurs dans lesquels la protéine

Ubx est normalement présente, à l'exception du parasegment 5 qui, pour une raison inconnue, devient un parasegment 6 (résultant peut-être d'un effet de dose de *Ubx*). Toutefois, tous les parasegments antérieurs au 5 sont aussi transformés en parasegments 6. Bien que ce résultat soit attendu, il est intéressant de considérer ce qui arrive au parasegment 13.

La transcription de *Ubx* est normalement supprimée dans le parasegment 13 chez les embryons sauvages, or quand la protéine exogène est produite artificiellement dans ce parasegment, rien ne se passe. Pour une raison quelconque, la protéine Ultrabithorax produite est inactivée dans ce parasegment. Ceci est lié à un phénomène classique lors de la spécification des parasegments et connu sous le terme de « suppression phénotypique » ou « prévalence postérieure ». Il signifie que les produits des gènes Hox normalement exprimés dans les régions antérieures sont inhibés par des produits de gènes postérieurs.

Bien que les rôles des complexes bithorax et Antennapedia dans le contrôle de l'identité segmentaire soient bien établis, comment ces gènes interagissent avec les gènes qui interviennent dans la suite du développement n'est pas encore bien connu. Ce sont des gènes qui spécifient des structures qui donnent aux segments leur identité propre. Qu'est ce qui est à l'origine par exemple d'un segment thoracique, plutôt qu'un segment abdominal ? Est-ce que chaque gène Hox active seulement quelques ou beaucoup de gènes cibles ? Est-ce que les gènes cibles agissent de concert pour former une structure particulière ?

Répondre à ces questions aidera à comprendre comment des changements au niveau d'un gène unique peuvent générer des changements homéotiques comme la transformation d'une antenne en patte. Le rôle des gènes Hox dans l'évolution des différentes parties du corps et dans l'évolution des membres sera abordé dans le Chapitre 14.

2.33 La tête chez la drosophile est spécifiée par des gènes distincts des gènes Hox

Comme il a été mentionné plus haut, la partie de la tête de la larve de la drosophile, en avant des mandibules, est formée par les trois parasegments les plus antérieurs. La segmentation de cette région se manifeste aussi dans le cerveau embryonnaire avec la présence de trois segments dits neuromères. La spécification de la partie antérieure de la tête et du système nerveux n'est cependant pas sous le contrôle des gènes pairrule ou des gènes Hox. Elle semble déterminée au stade blastoderme par les domaines d'expression chevauchants des gènes *orthodenticle, empty spiracle* et *buttonhead*, qui codent des facteurs de transcription et ressemblent aux gènes gap quant à leurs effets phénotypiques : ils sont donc parfois référencés comme les « gènes gap de la tête ». Contrairement aux gènes gap responsables de la formation du tronc et de l'abdomen, ils ne se régulent pas les uns les autres. On ne sait pas non plus s'ils agissent de manière combinée, comme les gènes Hox, de façon à donner une identité spécifique à chaque segment. *orthodenticle* et *empty spiracles* ont des homologues chez les vertébrés, et il apparaît clairement que le système de spécification de la tête, comme celui des gènes Hox, a une origine évolutive ancienne.

Les gènes *orthodenticle* et *empty spiracles* sont des exemples de gènes codant des facteurs de transcription à **homéodomaine** distincts des gènes Hox. En effet les protéines Hox ne sont pas les seules à posséder un homéodomaine, ce dernier étant observé dans de nombreux facteurs de transcription agissant au cours du développement chez la drosophile comme chez les vertébrés.

RÉSUMÉ

L'identité segmentaire est contrôlée par les gènes sélecteurs homéotiques, qui orchestrent le développement des parasegments. Deux groupes de gènes sélecteurs, répondant à la dénomination de gènes Hox, sont impliqués dans la spécification de

l'identité segmentaire chez la drosophile : le complexe Antennapedia, qui contrôle l'identité de parasegments de la tête et les cinq premiers segments thoraciques, et le complexe bithorax, agissant sur les parasegments restants. L'identité segmentaire semble être déterminée par l'activité combinée des gènes Hox dans chaque segment. L'expression spatiale des gènes sélecteurs chez l'embryon est initialement déterminée par l'activité des gènes gap, mais l'expression des gènes sélecteurs doit cependant être maintenue pendant le développement pour assurer l'expression du bon phénotype. Les mutations dans les gènes des complexes Antennapedia et bithorax peuvent produire des transformations homéotiques, au cours desquelles un segment ou une structure est transformé en un autre, par exemple une antenne en une patte. Les complexes Antennapedia et bithorax sont remarquables car l'ordre des gènes de ces complexes correspond à l'ordre de leur expression spatiale et temporelle chez l'embryon.



Résumé du chapitre 2

- Pendant l'ovogenèse, les protéines et ARNm maternels sont déposés dans l'œuf selon un agencement particulier. Cette organisation sera déterminante pour la formation des axes et sera à l'origine d'un ensemble d'informations de position.
- Les premières étapes du développement se déroulent alors que l'embryon est encore syncytial. Suite à la fécondation, les ARNm d'origine maternelle sont traduits et des gradients de facteurs de transcription, qui régionalisent grossièrement le corps selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral, sont formés.
- Ces facteurs de transcription entrent dans les noyaux et activent l'expression de gènes propres à l'embryon, ce qui induit une cascade d'activité de gènes zygotiques qui façonnent l'organisation de l'embryon.
- L'expression des gènes zygotiques définit le long de l'axe dorso-ventral plusieurs régions, comme le futur mésoderme et le futur tissu neural.
- Les premiers gènes zygotiques dont l'expression est activée le long de l'axe antéro-postérieur, sont les gènes gap, qui codent des facteurs de transcription, et dont l'expression subdivise l'embryon en différentes régions.
- La transition vers une organisation segmentée du corps se fait grâce aux gènes pair-rule, dont les régions d'expression sont spécifiées par les protéines gap et qui divisent l'axe antéro-postérieur en 14 parasegments.
- Au moment même où les gènes pair-rule s'expriment, le blastoderme commence à se cellulariser.
- Les gènes pair-rule définissent initialement l'expression spatiale des gènes de polarité segmentaire lesquels structurent les parasegments. Dès que l'embryon se cellularise, la mise en place de l'organisation de l'embryon dépend non seulement de facteurs de transcription, mais aussi de protéines de signalisation intercellulaire et de leurs récepteurs.
- Après la gastrulation, les segments définitifs de l'embryon âgé et de la larve se forment et correspondent à l'association de deux moitiés de parasegments consécutifs.

- Les frontières parasegmentaires séparent dans l'épiderme, des régions de restriction clonale nommées compartiments. Les frontières des compartiments persistent dans les segments, délimitant les parties antérieure et postérieure de chaque segment, ainsi que dans les disques imaginaux et dans les structures adultes qui dérivent de ces derniers, comme les ailes et les pattes.
- Les frontières des segments et des compartiments sont impliquées dans la construction et la polarisation des segments.
- L'identité de chaque segment est déterminée par deux complexes de gènes constitués de gènes sélecteurs homéotiques, connus en général sous le nom de gènes Hox. Le patron spatial d'expression de ces gènes est très largement déterminé par l'activité des gènes gap.
- L'épiderme de la drosophile présente une polarité cellulaire planaire, qui n'est vraiment visible que chez l'adulte où les « poils » du corps et des ailes s'orientent tous dans la même direction.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Comme il sera vu dans les chapitres suivants, l'étape de clivage conduit les œufs des vertébrés et de beaucoup d'autres animaux à former un groupe de cellules séparées. Au contraire, l'étape correspondante chez la drosophile produit un syncytium. Qu'est-ce qu'un syncytium, et comment celui-ci influence-t-il le développement précoce de l'embryon de drosophile ?

2. Le processus de segmentation a été très étudié chez l'embryon de drosophile. Que représentent les segments, et quel est leur rôle dans la stratégie utilisée par la drosophile pour construire l'embryon ? Des segments existent-ils dans l'espèce humaine ? Donner des exemples.

3. Résumer brièvement la méthode de criblage des mutations géniques utilisée par Nüsslein–Volhard et Wieschaus pour trouver des mutants du développement. En quoi les motifs denticulaires ont-ils été utiles dans ce criblage ?

4. Les gènes de développement agissent de façon hiérarchique pendant la construction embryonnaire. Ils définissent d'abord des grandes régions grossièrement définies, lesquelles sont secondairement affinées de façon à former une quantité plus importante de petites régions (voir Section 2.6). Résumer la façon dont ce principe est illustré au cours de l'embryogenèse précoce de la drosophile.

5. L'extrémité antérieure de l'embryon est établie localement par un haut niveau d'activité du facteur de transcription Bicoïd. La partie ventrale de l'embryon est établie par une forte activité du facteur de transcription Dorsal. Comparer les mécanismes qui régulent les activités de ces deux protéines.

6. Bicoïd a été le premier morphogène dont le mécanisme d'action moléculaire a été caractérisé. Un aspect important de ce travail a été de montrer comment un gradient continu et décroissant de Bicoïd pouvait conduire à générer une zone d'expression de *hunchback* très bien délimitée. Utiliser le système Bicoïd-Hunchback pour illustrer comment un seuil d'activation peut transformer un gradient continu en une région de développement restreinte. Ne pas oublier d'incorporer l'interaction coopérative de Bicoïd et du promoteur de *hunchback* dans la réponse.

7. L'axe dorso-ventral est établi par un gradient nucléaire du facteur de transcription Dorsal. Décrire les étapes qui conduisent à ce gradient en considérant l'enzyme Pipe, le ligand Spätzle, le récepteur Toll, la protéine Cactus et Dorsal elle-même.

8. La spécification de 14 parasegments le long de l'axe antéro-postérieur dépend de l'expression spatiale précise des gènes pair-rule. L'expression des gènes paire-rule dépend à son tour de celle des gènes gap. En utilisant la seconde bande d'expression de *even-skipped* comme modèle, résumer les interactions qui conduisent à la production correcte de Bicoïd, Hunchback, Krüppel, et Giant. Décrire en particulier comment le bord antérieur du domaine d'expression de Krüppel est fixé, et comment cette frontière détermine le bord postérieur de la bande d'expression 2 de *eve*.

9. Quel est le rôle particulier d'*engrailed* dans la mise en place du plan d'organisation de la drosophile ?

10. La drosophile a joué un rôle central dans notre compréhension du développement des insectes, mais n'est pas forcément un modèle du développement de tous les insectes. Comment le développement « à bandelette germinative longue » de la drosophile diffère-t-il du développement « à bandelette germinative courte » des scarabées, des sauterelles et des guêpes ?

11. Qu'entend-on par transformation homéotique ? Donner un exemple.

12. Des expériences démontrent que le rôle du complexe bithorax est de conduire les parasegments de la partie postérieure à acquérir une identité distincte de l'identité par défaut du parasegment 4. Décrire ces expériences et montrer comment elles illustrent l'importance des combinaisons de produits de gènes dans la spécification de l'identité segmentaire.

13. La production de drosophiles transgéniques en utilisant le transposon appelé élément P a joué un rôle complémentaire à celui des analyses mutationnelles classiques dans l'étude du contrôle génétique du développement. Répondre aux questions suivantes : pourquoi l'élément P est-il important dans cette approche ? Pourquoi l'élément P est-il injecté dans la partie postérieure de l'embryon avant sa cellularisation ? Pourquoi les mouches mutantes pour le gène *white* sont-elles utilisées classiquement dans ces expériences ? Enfin, quels sont les croisements génétiques nécessaires avant de pouvoir observer les effets de l'injection de l'élément P ?

QCM

- **NB.** Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.
- **1.** La chaîne nerveuse de la drosophile
- a) consiste en deux structures latérales qui s'étendent parallèlement de part et d'autre de l'animal.

	Gènes M z	laternels/ ygotiques	Nature de F la protéine (Facteur de transcription T), récepteur (R) ou	Fonction reconnue
Système antéro-postérieur	bicoid	М	P à homéodomaine	protéine signal (S) T	Morphogène fournissant une information de position le
	hunchback	M/Z	à doigts de zinc	т	long de l'axe AP Morphogène fournissant une information de position le
	nanos	М	se liant à l'ARN	-	long de l'axe AP Aide à établir le gradient AP de Hunchback
		м	a nomeocomaine	I S	Signalisation des cellules folliculaires
	oskar	M	la famille des TGF- α	C.	postérieures de l'ovocyte Détermination des cellules polaires
Système terminal	torso	М	Récepteur tyrosine	R	Spécification des régions terminales
	trunk	М	kinase	S	Ligand de Torso
Gènes gan	hunchback	7	à doigts de zinc	τ П	
661169 845	Krüppel	Z	à doigts de zinc	Ť	
	knirps	Z	à doigts de zinc	т 🛏	Localisation de l'expression des gènes pair-rule
	giant	Z	à glissière à leucine	т	
	tailless	Z	à doigts de zinc	т	
Gènes pair-rule	avon skippod	7	à homáodomaino	т	Délimite les parasegments exprimant odd
	fushi tarazu	7	à homéodomaine	Т	Délimite les parasegments exprimant even
		2	a nonicodomanic	Ť	
Gènes de segmentation	engrailed	Z	à homéodomaine	т	Définit la région antérieure des parasegments et la région postérieure des segments
	hedgehog	Z	de sécrétion	S J	
	wingless	Z	de sécrétion	S	
	frizzled	Z	Récepteur à 7 domair	nes R —	Constituants des voies de signalisation qui fournissent
			intramembranaires		un patron aux segments et qui stabilisent les limites
	patched	Z	Récepteur à 12 doma	aines R	des compartiments
	smoothened	Z	intramembranaires Récepteur à 7 domair	nes R _	
	Notch	7	Récenteur membrana	ire R	
	Serrate	Z	Membranaire, ligand o	de Notch S	
Gènes sélecteurs	Ultrabithorax	Z	à homéodomaine	тΠ	
du complexe bithorax	abdominal-A	Z	à homéodomaine	Ť –	Activité combinatoire conférant une identité aux
	Abdominal-B	Z	à homéodomaine	т 🔟	parasegments 5 à 13
du complexe	Deformed	7	à homéodomaine	тЛ	
Antennapedia	Sex combs	Z	à homéodomaine	Ť	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	reduced			—	Activité combinatoire conférant une identité aux
	Antennapedia	Z	à homéodomaine	Т	parasegments antérieurs au parasegment 5
	labial	Z	à homéodomaine	T _	
Gènes de maintenance	Groupe Polycom	nb Z		τ Л	Maintian de l'avaraccian des gànas homéatiques
Système dorso-ventral	Trithorax	Z		T _	Haimen de rexpression des genes nomeoriques
	Toll	М	Membranaire	R	Activation conduisant à la pénétration nucléaire de Dorsal
Genes maternels	spätzle	М	Extracellulaire	S	Ligand de Toll
	dorsal	М		Т	Morphogène mettant en place la polarité dorso-ventrale
	tube	М	Protéine adaptatrice	Г	Constituente de la veie de signalization Tall
	pelle	М	Protéine kinase		
Gènes zygotiques	cactus	М	Inhibitrice cytoplasmi	ique 🔄	conouisant a la penetration nuclealle de Dorsal
	gurken	M	Protéine sécrétée de la famille des TGF- α	S	Spécification de l'axe ovocytaire
	pipe	M	Sulfotransférase	Enzyme	intervention dans le processus de l'activation de Spatzle
	twist	2	a nelice-boucle-hélice	e []	Détermination du mésoderme
	snail	2	a doigts de zinc		
	rnomboid	2	riembranaire	<u> </u>	
	zerknuilt	Z	a nomeodomaine	I	
	uecapenta-	7	rioteine secretee de	_ ا	Confère l'identité régionale selon l'ave dorso-ventrale
	piegić tolloid	۲ ۲	ia ramille des TuF- β	i F	כסוויבוב המבוונונב ובצוטוומוב זבוטורו מצב מטו זס- אבוונומוב
	collolu short acctru	2	ue la famille BMP-1	2 c	
	snort yustfu-	4		ے د ا	
	iution				

RÉSUMÉ : Principaux gènes impliqués dans la spécification des structures du jeune embryon de drosophile

- b) n'est en aucune façon analogue de la moelle épinière des vertébrés, puisque la drosophile n'a pas de vertèbres !
- c) s'étend du côté dorsal, à l'opposé de la bouche comme chez les vertébrés, par exemple l'Homme.
- d) s'étend sur la surface ventrale, du même côté que la bouche.

2. Combien de parasegments sont-ils formés pendant la segmentation ?

- a) 8 dans l'abdomen.
- b) 11 dans le thorax et l'abdomen.
- c) 14, 3 pour la bouche, 3 thoraciques et 8 abdominaux.
- d) 3 pour l'ensemble tête, thorax et abdomen.
- **3.** À quel moment les pattes et les ailes se forment-elles ?
- a) pendant l'embryogenèse, quand les cellules des disques imaginaux se séparent du reste des cellules de l'embryon, au stade blastoderme cellulaire.
- b) pendant la métamorphose, à partir des disques imaginaux.
- c) pendant les mues larvaires.
- d) les pattes et les ailes sont présentes pendant les stades larvaires, mais prennent leur forme finale qu'après la métamorphose.

4. Quelle est la protéine qui détermine le destin antérieur de l'embryon de drosophile ?

- a) Bicoïd
- b) Caudal
- c) Nanos
- d) Torso
- 5. Les déterminants maternels sont :
- a) des gènes qui contrôlent la différenciation en mâle ou femelle.
- b) des protéines et des ARNm stockés dans l'œuf par la mère.
- c) des protéines et ARNm qui déterminent les axes de l'ovaire.
- d) des substances présentes chez la femelle qui déterminent sa capacité à procréer.
- 6. Quelle est la hiérarchie correcte de l'activité des gènes au cours
- de la segmentation de la drosophile ?
- a) Gènes gap, de polarité segmentaire, pair-rule, maternels.
- b) Gènes maternels, gap, pair-rule, de polarité segmentaire.
- c) Gènes maternels, pair-rule, gap, de polarité segmentaire.
- d) Gènes de polarité segmentaire, pair-rule, gap, maternels.

7. Parmi ces défauts du plan embryonnaire, lesquels pourraient être causés par une mutation d'un gène gap ?

- a) Un segment sur deux est manquant, sont présents T1, T3, A2, A4, etc., et absents T2, A1, A3, etc..
- b) L'organisation de chaque segment est anormale et se manifeste par la formation de denticules dans tout le segment.
- c) Les segments A2 jusqu'à A6 sont manquants, pour le reste, l'organisation est normale.
- d) L'identité d'un ou plusieurs segments est modifiée.
- 8. La formation des segments séparant les cellules est initiée par a) les gènes gap.
- b) les gènes maternels.
- c) les gènes pair-rule.
- d) les gènes de polarité segmentaire.
- 9. L'expression d'engrailed définit :
- a) le compartiment antérieur du segment.
- b) le bord antérieur de chaque segment.
- c) le compartiment postérieur du segment.
- d) le bord postérieur de chaque parasegment.

10. L'organisation antérieure de l'embryon de type « à bandelette germinative longue » de la guêpe Nasonia est sous le contrôle de

- a) Bicoïd
- b) Engrailed c) Krüppel
- d) Orthodenticle

Réponses aux QCM

1 : d, 2 : c, 3 : b, 4 : a, 5 : b, 6 : b, 7 : c, 8 : c, 9 : c, 10 : d.

Références bibliographiques générales

- Adams, M.D., et al. : The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science 2000, 267: 2185-2195.
- Bate, M., Martinez Arias, A. (Eds) : The Development of Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor Press : 1993.
- Greenspan, R. Fly Pushing : The Theory and Practice of Drosophila Genetics. Cold Spring Harbor Press : 2004.
- Lawrence, P.A. : The Making of a Fly. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992.

Matthews, K.A., Kaufman, T.C., Gelbart, W.M. : Research resources for Drosophila : the expanding universe. Nat Rev. Genet. 2005, 6: 179-193.

Stolc, V., et al. : A gene expression map for the euchromatic genome of Drosophila melanogaster. Science 2004, 306 : 655-660.

Perrimon, N., Pitsouli, C., Shilo, B.Z. : Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012, 4: a005975.

Références bibliographiques spécifiques

2.2 La cellularisation est suivie de la gastrulation et de la segmentation

Foe, V.E., Alberts, B.M. : Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in Drosophila embryogenesis. J. Cell Sci. 1983, **61**: 31-70.

Leptin, M. : Gastrulation in Drosophila : the logic and the cellular mechanisms. EMBO J. 1999, 18: 3187-3192.

Stathopoulos, A., Levine, M. : Whole-genome analysis of Drosophila gastrulation. Curr. Opin. Genet. Dev. 2004, 14: 477-484.

2.4 De nombreux gènes du développement ont été identifiés chez la drosophile par criblage génétique à grande échelle

Nusslein-Volhard. C., Wieschaus, E. : Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature 1980, **287**: 795-801.

ENCART 2A Mutagenèse et stratégie de criblage génétique pour identifier des mutants de développement chez la drosophile

Greenspan, R. : Fly Pushing : The Theory and Practice of Drosophila Genetics. Cold Spring Harbor Press, 2004

2.7 Trois classes de gènes maternels spécifient l'axe antéropostérieur

St Johnston, D., Nüsslein-Volhard, C. : The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. Cell 1992, 68: 201-219.

2.8 La protéine morphogène Bicoïd est distribuée selon un gradient antéro-postérieur

- Driever, W., Nüsslein-Volhard, C. : **The bicoïd protein determines position in the** *Drosophila* **embryo in a concentration dependent manner**. *Cell* 1988, **54** : 95–104.
- Ephrussi, A., St Johnston, D. : Seeing is believing : the bicoïd morphogen gradient matures. *Cell* 2004, **116** : 143–152.
- Gibson, M.C. : Bicoïd by the numbers : quantifying a morphogen gradient. *Cell* 2007, **130** : 14–16.
- Morrison, A.H., Scheeler, M., Dubuis, J., Gregor, T. : Quantifying the bicoïd morphogen gadient in living fly embryos. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, doi :10.1101/pdb.top068536
- Gregor, T., Wieschaus, E.F., McGregor, A.P., Bialek, W., Tank, D.W.: 2007, Stability and nuclear dynamics of the bicoïd morphogen gradient. *Cell* 130 : 141–152.
- Porcher, A., Dostatni, N. : **The bicoïd morphogen system**. *Curr. Biol.* 2010, **20** : R249–R254.

2.9 L'organisation postérieure est contrôlée par les gradients des protéines Nanos et Caudal

- Irish, V., Lehmann, R., Akam, M. : **The** *Drosophila* **posteriorgroup gene** *nanos* **functions by repressing** *hunchback* **activity**. *Nature* 1989, **338 :** 646–648.
- Murafta, Y., Wharton, R.P. : Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in Drosophila embryos. Cell 1995, 80 : 747–756.
- Rivera-Pomar, R., Lu, X., Perrimon, N., Taubert, H., Jackle, H. : Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm. *Nature* 1995, **376** : 253–256.
- Struhl, G. : Differing strategies for organizing anterior and posterior body pattern in *Drosophila* embryos. *Nature* 1989, 338 : 741–744.

2.10 Les extrémités antérieure et postérieure de l'embryon sont déterminées par l'activation d'un récepteur membranaire

- Casali, A., Casanova, J. : **The spatial control of Torso RTK** activation : a C-terminal fragment of the Trunk protein acts as a signal for Torso receptor in the *Drosophila* embryo. *Development* 2001, **128** : 1709–1715.
- Casanova, J., Struhl, G. : Localized surface activity of torso, a receptor tyrosine kinase, specifies terminal body pattern in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1989, **3** : 2025–2038.
- Coppey, M., Boettiger, A.N., Berezhkovskii, A.M., Shvartsman,
 S.Y. : Nuclear trapping shapes the terminal gradient in the *Drosophila* embryo. *Curr. Biol.* 2008, 18 : 915–919.
- Furriols, M., Casanova, J. : In and out of Torso RTK signalling. *EMBO J.* 2003, **22 :** 1947–1952.
- Furriols, M., Ventura, G., Casanova, J. : Two distinct but convergent groups of cells trigger Torso receptor tyrosine kinase activation by independently expressing torso-like. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007, 104 : 11660–11665.
- Li, W.X. : Functions and mechanisms of receptor tyrosine kinase Torso signaling : lessons from *Drosophila* embryonic terminal development. *Dev. Dyn.* 2005, 232 : 656–672.

2.11 La polarité dorso-ventrale de l'embryon est déterminée par la localisation de protéines maternelles dans l'espace périvitellin

Anderson, K.V. : **Pinning down positional information : dorsalventral polarity in the** *Drosophila* **embryo**. *Cell* 1998, **95 :** 439–442.

- Sen, J., Goltz, J.S., Stevens, L., Stein, D. : Spatially restricted expression of *pipe* in the *Drosophila* egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell* 1998, 95 : 471–481.
- Shilo, B.Z., Haskel-Ittah, M., Ben-Zvi, D., Schejter, E.D., Barkai, N. : **Creating gradients by morphogen shuttling**. *Trends Genet*. 2013, **29** : 339–347.

2.12 Dorsal génère une information de position le long de l'axe dorso-ventral

- Roth, S., Stein, D., Nüsslein-Volhard, C. : A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorso-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 1989, **59** : 1189–1202.
- Steward, R., Govind, R. : Dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. Curr. Opin. Genet. Dev. 1993, 3 : 556–561.

ENCART 2B La voie de signalisation Toll : une voie multifonctionelle

- Belvin, M.P., Anderson, K.V. : A conserved signaling pathway : the Drosophila Toll-dorsal pathway. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1996, 12 : 393–416.
- Ferrandon, D., Imler, J.L., Hoffmann, J.A. : Sensing infection in Drosophila : Toll and beyond. Semin. Immunol. 2004, 16 : 43–53.
- Imler, J.L., Hoffmann, J.A. : **Toll receptors in** *Drosophila : a* **family of molecules regulating development and immunity**. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002, **270 :** 63–79.
- Valanne, S., Wang, J.H., Rämet, M. : The Drosophila Toll signaling pathway. J. Immunol. 2011, 186 : 649–656.

2.13 L'axe antéro-postérieur de l'œuf de drosophile est déterminé par des signaux provenant de la chambre à œuf et par des interactions entre l'ovocyte et les cellules folliculaires

- González-Reyes, A., St Johnston, D. : The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* 1998, **125** : 3635–3644.
- Huynh, J.R., St Johnston, D. : **The origin of asymmetry : early polarization of the** *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Curr. Biol.* 2004, **14 :** R438–R449.
- Riechmann, V., Ephrussi, A. : Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001, 11 : 374–383.
- Roth, S., Lynch, J.A. : **Symmetry breaking during** *Drosophila* **oogenesis**. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009, **1** : a001891.
- Torres, I.L., Lopez-Schier, H., St Johnston, D. : A Notch/Deltadependent relay mechanism establishes anterior-posterior polarity in Drosophila. Dev. Cell 2005, 5 : 547–558.
- Zimyanin, V.L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M.J., Clark, A., Davis, I., St Johnston, D. : In vivo imaging of *oskar* mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* 2008, **134** : 843–853.

ENCART 2C La voie de signalisation JAK-STAT

- Arbouzova, N.I., Zeidler, M.P. : JAK/STAT signalling in Drosophila : insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 2006, 133 : 2605–2616.
- Hombría, J.C., Sotillos, S. : JAK-STAT pathway in *Drosophila* morphogenesis : from organ selector to cell behavior regulator. *JAKSTAT* 2013, 2 : e26089.

2.14 La localisation des ARNm maternels aux extrémités de l'ovocyte dépend de la réorganisation de son cytosquelette

Becalska, A.N., Gavis, E.R. : Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development* 2009, **136** : 2493–2503.

Martin, S.G., Leclerc, V., Smith-Litière, K., St Johnston, D. : The identification of novel genes required for *Drosophila* anteroposterior axis formation in a germline clone screen using GFP-Staufen. *Development* 2003, 130 : 4201–4215.

St Johnston, D. : Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6: 363–375.

2.15 L'axe dorso-ventral de l'œuf est spécifié par un déplacement du noyau ovocytaire suivi par des signalisations entre l'ovocyte et les cellules folliculaires

González-Reyes, A., Elliott, H., St Johnston, D. : **Polarization** of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signaling. *Nature* 1995, **375 :** 654–658.

Jordan, K.C., Clegg, N.J., Blasi, J.A., Morimoto, A.M., Sen, J., Stein, D., McNeill, H., Deng, W.M., Tworoger, M., Ruohola-Baker, H. : The homeobox gene *mirror* links EGF signalling to embryonic dorso-ventral axis formation through Notch activation. *Nat. Genet.* 2000, 24 : 429–433.

Roth, S., Neuman-Silberberg, F.S., Barcelo, G., Schupbach,
 T. : Cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 1995, 81 : 967–978.

van Eeden, F., St Johnston, D. : The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999, 9: 396–404.

2.16 L'expression des gènes zygotiques selon l'axe dorsoventral est contrôlée par la protéine Dorsal

Cowden, J., Levine, M. : Ventral dominance governs segmental patterns of gene expression across the dorsal-ventral axis of the neurectoderm in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* 2003, 262: 335–349.

Harland, R.M. : A twist on embryonic signalling. *Nature* 2001, **410 :** 423–424.

Markstein, M., Zinzen, R., Markstein, P., Yee, K.P., Erives, A., Stathopoulos, A., Levine, M. : A regulatory code for neurogenic gene expression in the *Drosophila* embryo. *Development* 2004, 131 : 2387–2394.

Reeves, G.T., Stathopoulos, A. : Graded dorsal and differential gene regulation in the Drosophila embryo. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009, **1** : a000836.

Reeves, G.T., Trisnadi, N., Truong, T.V., Nahmad, M, Katz, S., Stathopoulos, A. : Dorsal-ventral gene expression in the *Drosophila* embryo reflects the dynamics and precision of the dorsal nuclear gradient. *Dev. Cell* 2012, 22 : 544–557.

Rusch, J., Levine, M. : Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the *Drosophila* embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996, 6 : 416–423.

Stathopoulos, A., Levine, M. : Dorsal gradient networks in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* 2002, **246** : 57–67.

2.17 La protéine Decapentaplegic agit comme un morphogène qui modèle la région dorsale de l'embryon

Affolter, M., Basler, K. : **The Decapentaplegic morphogen** gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat. Rev. Genet.* 2007, **8 :** 663–674.

Ashe, H.L., Levine, M. : Local inhibition and long-range enhancement of Dpp signal transduction by Sog. *Nature* 1999, 398 : 427–431.

- Mizutani, C.M., Nie, Q., Wan, F.Y., Zhang, Y.T., Vilmos, P., Sousa-Neves, R., Bier, E., Marsh, J.L., Lander, A.D. : Formation of the BMP activity gradient in the *Drosophila* embryo. *Dev. Cell* 2005, 8 : 915–924.
- Shimmi, O., Umulis, D., Othmer, H., O'Connor, M.B. : Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the *Drosophila* blastoderm embryo. *Cell* 2005, **120** : 873–886.

Srinivasan, S., Rashka, K.E., Bier, E. : Creation of a Sog morphogen gradient in the Drosophila embryo. Dev. Cell 2002, 2 : 91–101.

Wang, Y.-C., Ferguson, E.L. : **Spatial bistability of Dpp-receptor interactions driving** *Drosophila* **dorsal-ventral patterning**. *Nature* 2005, **434** : 229–234.

Wharton, K.A., Ray, R.P., Gelbart, W.M. : An activity gradient of decapentaplegic is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the *Drosophila* embryo. *Development* 1993, **117** : 807–822.

2.18 L'axe antéro-postérieur est subdivisé en grandes régions par l'expression des gènes gap

Rivera-Pomar, R., Jäckle, H. : From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis : filling in the gaps. *Trends Genet*. 1996, **12** : 478–483.

2.19 La protéine Bicoïd délivre un signal de position qui contrôle l'expression antérieure du gène hunchback zygotique

Brand, A.H., Perrimon, N. : **Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes**. *Development* 1993, **118** : 401–415.

Gibson, M.C. : Bicoïd by the numbers : quantifying a morphogen gradient. *Cell* 2007, **130** : 14–16.

Gregor, T., Tank, D.W., Wieschaus, E.F., Bialek W. : **Probing the limits to positional information**. *Cell* 2007, **130** : 153–164.

Jaeger, J., Martinez Arias, A. : Getting the measure of positional information. *PLoS Biol.* 2009, **7** : e81.

Ochoa-Espinosa, A., Yucel, G., Kaplan, L., Pare, A., Pura, N., Oberstein, A., Papatsenko, D., Small, S. : The role of binding site cluster strength in Bicoïd-dependent patterning in Drosophila. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2005, 102 : 4960–4965.

Simpson-Brose, M., Treisman, J., Desplan, C. : Synergy between the Hunchback and Bicoïd morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. *Cell* 1994, **78** : 855–865.

Struhl, G., Struhl, K., Macdonald, P.M. : The gradient morphogen Bicoïd is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell* 1989, 57 : 1259–1273.

ENCART 2D Transgénèse s'effectuant parl'intermédiaire de l'élément P

Venken, K.J.T., Bellen, H.J. : Transgenesis upgrades for Drosophila melanogaster. Development 2007, 134 : 3571–3584.

ENCART 2E Expression de gènes cibles et dépistage de défauts d'expression

Duffy, J.B. : GAL4 system in *Drosophila* : a fly geneticist's Swiss knife. *Genesis* 2002, 34 : 1–15.

Zhong, J., Yedvobnick, B. : **Targeted gain-of-function screening in** *Drosophila* **using GAL4-UAS and random transposon insertions**. *Genet. Res.* (*Camb*) 2009, **91** : 243–258.

2.20 Le gradient de la protéine Hunchback active et réprime d'autres gènes gap

- Struhl, G., Johnston, P., Lawrence, P.A. : Control of *Drosophila* body pattern by the hunchback morphogen gradient. *Cell* 1992, **69** : 237–249.
- Wu, X., Vakani, R., Small, S. : Two distinct mechanisms for differential positioning of gene expression borders involving the Drosophila gap protein giant. Development 1998, 125 : 3765–3774.

2.21 Les parasegments sont délimités par les patrons d'expression périodiques des gènes pair-rule

- Clyde, D.E., Corado, M.S., Wu, X., Paré, A., Papatsenko, D., Small, S. : A self-organizing system of repressor gradients establishes segmental complexity in *Drosophila*. *Nature* 2003, 426 : 849–853.
- Hughes, S.C., Krause, H.M. : Establishment and maintenance of parasegmental compartments. *Development* 2001, **128** : 1109–1118.
- Jaynes, J.B., Fujioka, M. : Drawing lines in the sand : even skipped et al. and parasegment boundaries. *Dev. Biol.* 2004, 269 : 609–622.
- Yu, D., Small, D. : Precise registration of gene expression boundaries by a repressive morphogen in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2008, **18** : 888–876.

2.22 L'activité des gènes gap détermine la position des bandes d'expression des gènes pair-rule

Small, S., Levine, M. : The initiation of pair-rule stripes in the Drosophila blastoderm. Curr. Opin. Genet. Dev. 1991, 1 : 255–260.

2.23 Les insectes utilisent différents mécanismes pour modeler leur architecture corporelle

- Akam, M., Dawes, R. : More than one way to slice an egg. *Curr. Biol.* 1992, **8**: 395–398.
- Angelini, D.R., Liu, P.Z., Hughes, C.L., Kaufman, T.C. : Hox gene function and interaction in the milkweed bug Oncopeltus fasciatus (Hemiptera). Dev. Biol. 2005, 287 : 440–455.
- Brown, S.J., Parrish, J.K., Beeman, R.W., Denell, R.E. : Molecular characterization and embryonic expression of the *even-skipped* ortholog of *Tribolium castaneum*. *Mech. Dev.* 1997, 61 : 165–173.
- French, V. : Segmentation (and *eve*) in very odd insect embryos. *BioEssays* 1996, **18 :** 435–438.
- French, V. : Insect segmentation : genes, stripes and segments in 'Hoppers'. *Curr. Biol.* 2001, **11** : R910–R913.
- Lynch, J.A., Brent, A.E., Leaf, D.S., Pultz, M.A., Desplan, C. : Localized maternal orthodenticle patterns anterior and posterior in the long germ wasp Nasonia. Nature 2006, 439 : 728–732.
- Sander, K. : **Pattern formation in the insect embryo**. In *Cell Patterning, Ciba Found. Symp. 29*. London : Ciba Foundation, 1975 : 241–263.
- Tautz, D., Sommer, R.J.: Evolution of segmentation genes in insects. *Trends Genet*. 1995, **11**: 23–27.

2.24 L'expression du gene *engrailed* définit les frontières parasegmentaires qui sont également des limites de restriction clonale

2.25 Les gènes de polarité segmentaire stabilisent les frontières parasegmentaires

&

2.26 Des signaux émis à la frontière parasegmentaire délimitent et organisent les futurs segments

- Alexandre, C., Lecourtois, M., Vincent, J.-P. : Wingless and hedgehog pattern *Drosophila* denticle belts by regulating the production of short-range signals. *Development* 1999, **126**: 5689–5698.
- Chanut-Delalande, H., Fernandes, I., Roch, F., Payre, F., Plaza,
 S. : *Shavenbaby* couples patterning to epidermal cell shape control. *PLoS Biol.* 2006, 4: e290.
- Dahmann, C., Basler, K. : Compartment boundaries : at the edge of development. Trends Genet. 1999, 15 : 320–326.
- Gordon, M., Nusse, R. : Wnt signaling : multiple pathways : multiple receptors, and multiple transcription factors. J. Biol. Chem. 2006, **281** : 22429–22433.
- Hatini, V., DiNardo, S. : Divide and conquer: pattern formation in *Drosophila* embryonic epidermis. *Trends Genet*. 2001, 17 : 574–579.
- Hooper, J.E., Scott, M.P. : **Communicating with Hedgehogs**. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, **6**: 306–317.
- Larsen, C.W., Hirst, E., Alexandre, C., Vincent, J.-P. : Segment boundary formation in *Drosophila* embryos. *Development* 2003, 130 : 5625–5635.
- Lawrence, P.A., Casal, J., Struhl, G. : **Hedgehog and engrailed:** pattern formation and polarity in the Drosophila abdomen. *Development* 1999, **126** : 2431–2439.
- Sanson, B. : Generating patterns from fields of cells. Examples from Drosophila segmentation. EMBO Rep. 2001, 2 : 1083–1088.
- Tolwinski, N.S., Wieschaus, E. : **Rethinking Wnt signaling**. *Trends Genet*. 2004, **20** : 177–181
- von Dassow, G., Meir, E., Munro, E.M., Odell, G.M. : **The segment polarity network is a robust developmental module**. *Nature* 2000, **406** : 188–192.
- Vincent, J.P., O'Farrell, P.H. : The state of *engrailed* expression is not clonally transmitted during early *Drosophila* development. *Cell* 1992, **68** : 923–931.

ENCART 2F La voie de signalisation Hedgehog

Briscoe, J., Thérond, P.P. : **The mechanisms of Hedgehog** signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013, **14** : 416–429.

ENCART 2G Les mutants affectant l'organisation des denticules donnent des informations sur l'organisation des segments

- Martinez Arias, A., Baker, N.E., Ingham, P.W. : Role of segment polarity genes in the definition and maintenance of cell states in the *Drosophila* embryo. *Development* 1988, **103** : 157–170.
- Martinez Arias, A. : A cellular basis for pattern formation in the insect epidermis. *Trends Genet.* 1989, **5** : 262–267.

2.27 Les compartiments perdurent chez la mouche adulte

&

2.28 Les cellules épidermiques des insectes deviennent polarisées individuellement suivant une direction antéropostérieure dans le plan de l'épithélium

ENCART 21 Polarité planaire chez la drosophile

- Lawrence, P.A., Casal, J., Struhl, G. : **Cell interactions and planar polarity in the abdominal epidermis of** *Drosophila*. *Development* 2004, **131 :** 4651–4664.
- Lawrence, P.A., Struhl, G., Casal, J. : Planar polarity : one or two pathways. Nat. Rev. Genet. 2008, 8 : 555–363.
- Ma, D., Yang, C., McNeill, H., Simon, M.A., Axelrod, J.D. : Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* 2003, **421** : 543–547.
- Strutt, D. : The planar polarity pathway. *Curr. Biol.* 2008, 16 : R898–R902.
- Strutt, D., Strutt, H. : Differential activities of the core planar polarity proteins during *Drosophila* wing patterning. *Dev. Biol.* 2007, **302** : 181–194.
- Wu, J., Mlodzik, M. : The Frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stm during nonautonomous planar cell polarity

2.29 Les gènes Hox spécifient l'identité des segments chez la drosophile

- Hueber, S.D., Lohmann, I. : **Shaping segments : Hox gene function in the genomic age**. *BioEssays* 2008, **30 :** 965–979.
- Lewis E.B. : A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978, **276** : 565–570.
- Mallo, M., Alonso, C.R. : **The regulation of Hox gene expression during animal development**. *Development* 2013, **140** : 3951– 3963.

2.30 Les gènes sélecteurs homéotiques du complexe bithorax sont responsables de la diversification des segments postérieurs

&

2.31 Le complexe Antennapedia contrôle la specification des régions antérieures

- Castelli-Gair, J., Akam, M. : **How the Hox gene** *Ultrabithorax* **specifies two different segments : the significance of spatial and temporal regulation within metameres**. *Development* 1995, **121 :** 2973–2982.
- Lawrence, P.A, Morata, G. : Homeobox genes : their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* 1994, 78 : 181–189.
- Mann, R.S., Morata, G. : The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. Annu. *Rev. Cell Dev. Biol.* 2000, 16 : 143–271.
- Mannervik, M. : Target genes of homeodomain proteins. *BioEssays* 1999, 4 : 267–270.
- Simon, J. : Locking in stable states of gene expression : transcriptional control during Drosophila development. Curr. Opin. Cell Biol. 1995, 7: 376–385.

2.32 L'ordre d'expression des gènes Hox correspond à leur ordre sur le chromosome

Morata, G. : Homeotic genes of Drosophila. Curr. Opin. Genet. Dev. 1993, 3 : 606–614.

2.33 La tête chez la drosophile est spécifiée par des gènes distincts des gènes Hox

Rogers B.T., Kaufman, T.C. : **Structure of the insect head in ontogeny and phylogeny : a view from** *Drosophila*. *Int. Rev. Cytol.* 1997, **174 :** 1–84.

3

Développement des vertébrés I : cycles de vie et techniques expérimentales

 Cycles de vie des vertébrés et grands traits du développement Approches expérimentales pour étudier le développement des vertébrés

Dans ce chapitre, sont abordées les similarités et les différences dans les grands traits du développement de quatre animaux modèles chez les vertébrés : le xénope pour les amphibiens, le poisson-zèbre pour les poissons, le poulet pour les oiseaux et la souris pour les mammifères. Le développement humain est aussi rapidement considéré. La deuxième partie de ce chapitre introduit quelques-unes des approches expérimentales utilisées pour étudier le développement des vertébrés à l'aide de ces quatre organismes modèles.

Le chapitre 2 a abordé la manière dont des facteurs maternels interagissent les uns avec les autres pour contrôler le développement précoce des insectes et définir globalement l'identité des différentes régions du corps. Ce plan d'organisation initial est ainsi élaboré à partir des propres gènes de l'embryon. Maintenant va être étudié comment s'établissent ces mêmes grands traits du plan d'organisation au cours du développement précoce des vertébrés. Tous les vertébrés, malgré leurs nombreuses et flagrantes différences, ont un plan d'organisation similaire dont les structures déterminantes sont la colonne vertébrale entourant la moelle épinière, avec, à son extrémité céphalique, le cerveau enfermé dans un crâne osseux ou cartilagineux (Fig. 3.1). Ces structures remarquables marquent l'axe antéro-postérieur, axe principal du corps des vertébrés. La tête est à l'extrémité antérieure de cet axe, suivie par le tronc avec ses appendices pairs, les membres chez les vertébrés terrestres (sauf pour les serpents et les orvets) et les nageoires chez les poissons. Chez de nombreux vertébrés cet axe se termine à l'extrémité postérieure par une queue en position postanale. Le corps des vertébrés est organisé le long d'un axe dorso-ventral, reliant les faces dorsale et ventrale, la moelle épinière longeant la face dorsale et la position de la bouche définissant la face ventrale. Les axes antéro-postérieur et dorso-ventral définissent ensemble les côtés droit et gauche du corps de l'animal. Les vertébrés possèdent une symétrie bilatérale définie à partir d'un plan sagittal médian, si bien qu'en vue externe, les côtés droit et gauche sont des images en miroir l'un de l'autre. Certains organes internes, tels les poumons, les reins et les organes génitaux sont des structures paires symétriques, bien que leur anatomie ou leur position précise puisse



Fig. 3.1 Le squelette d'un embryon de souris au jour 17,5 (E17,5) permet d'illustrer le plan d'organisation des vertébrés. Les éléments du squelette de cet embryon ont été colorés au bleu alcian (qui révèle le cartilage) et au rouge d'alizarine (qui colore l'os). Le cerveau est enfermé dans un crâne osseux. La colonne vertébrale, qui se développe à partir des blocs de somites, est divisée en régions cervicale (cou), thoracique (poitrine), lombaire (bas du dos) et sacrée (hanches et parties inférieures). Les membres pairs peuvent aussi être visualisés. Barre d'échelle = 1 mm.

Photographie aimablement communiquée par M. Maden. différer entre les côtés droit et gauche. Les organes impairs, comme le cœur ou le foie, ne présentent pas de symétrie par rapport au plan médian, le cœur étant à gauche et le foie à droite.

Dans ce chapitre et les deux suivants, seront étudiés quatre vertébrés au développement précoce particulièrement bien caractérisé, xénope, poisson-zèbre, poulet et souris, ainsi que le développement précoce de l'embryon humain. Les cycles de vie de ces organismes seront également précisés avec les caractéristiques clés de leur développement précoce, esquissant ainsi le contexte général de discussions futures. À ce stade, les mécanismes du développement ne seront pas envisagés, mais seront pointés les changements de forme ayant lieu lors du développement embryonnaire précoce fournissant le plan d'organisation d'ensemble bien défini de l'embryon de vertébrés, avec ses structures types comme la chorde ou le tube neural. L'embryon sera considéré depuis la première division qui affecte le zygote, puis lors des mouvements cellulaires associés à la gastrulation, processus dynamique par lequel l'embryon subit un réarrangement permettant un agencement corporel correct des trois feuillets embryonnaires, jusqu'à la fin de la neurulation conduisant à la formation du tube neural, première manifestation du système nerveux. Les feuillets embryonnaires sont l'ectoderme à l'origine du système nerveux et de l'épiderme, le mésoderme donnant le squelette, les muscles, le cœur, le sang, et d'autres organes et tissus internes, et l'endoderme à l'origine du tube digestif et de ses glandes et organes associés (Encart 1C). La seconde partie du chapitre présentera quelques techniques expérimentales utilisées pour étudier le développement des vertébrés.

Le chapitre 4 détaillera ensuite les mécanismes aboutissant au plan d'organisation chez le xénope. Seront étudiées la détermination des axes antéro-postérieur et dorso-ventral et la spécification des feuillets embryonnaires puis leur organisation générale. La mise en place du centre organisateur sera ensuite abordée (Section 1.4), ainsi que la façon dont celui-ci dirige l'organisation du corps de l'animal, avec notamment l'étape fondamentale de l'induction du futur système nerveux. Ces mécanismes seront ensuite comparés à ceux impliqués dans l'établissement du plan d'organisation du corps chez le poisson-zèbre. Le chapitre 5 considérera la réalisation de ces mêmes processus chez d'autres organismes modèles : le poulet et la souris. Seront ensuite décrites les modalités du contrôle du développement futur du mésoderme, de la formation de la chorde et de la segmentation des lames mésodermiques en somites, de part et d'autre de la chorde, qui formeront par la suite des muscles et des tissus osseux. L'origine et le développement des crêtes neurales seront aussi étudiés, et comment ces dernières contribuent ensuite à une large gamme de tissus variés, incluant le système nerveux périphérique et des tissus conjonctifs de la tête. Enfin sera esquissée la mise en place de l'asymétrie droite-gauche. À l'issue de tous ces processus, l'embryon est devenu un vertébré reconnaissable. Le développement des structures et des organes individuels, tels les membres, yeux, cœur et système nerveux fera l'objet des chapitres suivants. Les mécanismes de la gastrulation chez les vertébrés et la biologie cellulaire sous-jacente, liée notamment à l'important remodelage tissulaire, seront détaillés dans le chapitre 9, avec la gastrulation chez des animaux non-vertébrés à organisation plus simple, comme les oursins.

Les cycles de vie des vertébrés et les grands traits de leur développement

Tous les embryons de vertébrés passent par un ensemble de stades de développement largement similaires, qui sont résumés pour chaque organisme, dans ce chapitre, par un schéma du cycle vital (par exemple, celui du xénope présenté Fig. 3.3). Après fécondation, le zygote subit la phase de **segmentation** (ou **clivage**). Ces divisions cellulaires rapides divisent l'embryon en un certain nombre de cellules plus petites. Cette phase est suivie par la **gastrulation**, ensemble de mouvements cellulaires générant les trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme (Encart 1C). À la fin de la gastrulation, l'ectoderme recouvre l'embryon alors que les mésoderme et endoderme ont pénétré à l'intérieur de ce dernier. L'endoderme donne naissance au tube digestif et à ses dérivés, tels le foie et les poumons. Le mésoderme forme le squelette, les muscles, les tissus conjonctifs, les reins, le cœur et le sang ainsi que d'autres tissus, et l'ectoderme est à l'origine de l'épiderme et du système nerveux.

La figure 3.2 montre les différences morphologiques des embryons précoces des quatre espèces modèles et de l'embryon humain à des stades équivalents. Après la gastrulation, tous les embryons de vertébrés passent par un stade au cours duquel ils se ressemblent tous plus ou moins, montrant les caractéristiques embryonnaires spécifiques des chordés, le phylum de métazoaires auquel appartiennent les vertébrés. C'est le **stade phylotypique**, avec une tête distincte et le **tube neural**, précurseur du système nerveux, qui s'étend le long de la ligne médiane dorsale de l'axe antéro-postérieur. Immédiatement sous le tube neural se situe la **chorde**, une structure



Fig. 3.2 Les embryons de vertébrés présentent des différences considérables de forme avant la gastrulation, mais au-delà tous passent par un stade où ils se ressemblent beaucoup. Les œufs de xénope (Xenopus), poisson-zèbre, poulet et souris sont très différents en termes de taille tandis que les œufs humains ont sensiblement la même taille que ceux de souris (ligne du haut). Les barres d'échelle dans cette ligne représentent toutes 1 mm, excepté pour le poulet, pour lequel elle correspond à 10 mm. L'œuf de poule, dont la majeure partie du volume est occupée par le blanc d'œuf, comporte une celluleœuf qui contient le vitellus. Le développement précoce (deuxième ligne) est relativement différent d'un groupe à l'autre. Dans cette rangée, les embryons sont présentés en coupe transversale au stade correspondant approximativement à la blastula de xénope (partie de gauche) juste avant que la gastrulation ne commence. Le principal déterminant de l'arrangement tissulaire est la quantité de vitellus (en jaune) dans l'œuf. À ce stade, les embryons murin et humain (sur la

droite) sont implantés dans la muqueuse utérine et ont déjà développé des tissus extra-embryonnaires nécessaires à leur implantation. L'embryon de souris proprement dit, se présente sous la forme d'une coupelle vue ici en coupe transversale et est constitué par une couche épithéliale en forme de U. L'embryon humain proprement dit (vu ici en section transversale) se présente sous la forme d'un disque constitué par une couche épithéliale plane. Les barres d'échelle pour les embryons murin et humain = 100 µm. Après la gastrulation et la formation du tube neural, les embryons de vertébrés passent par un stade embryonnaire au cours duquel ils se ressemblent beaucoup (troisième ligne) et qui est nommé stade phylotypique. Le corps est développé et le tube neural, les somites, la chorde et les structures de la tête sont présents. Les barres d'échelle = 1 mm. Après ce stade, leur développement diverge à nouveau. Les appendices pairs, par exemple, se développent en nageoires pour les poissons, ailes et pattes pour le poulet, et bras et jambes pour les humains (ligne du bas).

propre aux chordés, flanquée de chaque côté par les **somites**, des structures à partir desquelles dériveront les muscles et le squelette. Chez les vertébrés, les structures qui se forment le long de cet axe principal du corps, comme la chorde, le tube neural et la colonne vertébrale, sont qualifiées de **structures axiales** (les somites sont paraaxiaux). Les caractéristiques propres aux différents groupes de vertébrés, comme les becs, les ailes ou les nageoires se forment plus tardivement.

La chorde, de forme tubulaire, est une des premières structures mésodermiques identifiées chez un embryon de vertébré. Cette structure ne persiste pas et ses cellules sont finalement intégrées à la colonne vertébrale lors de sa formation (Fig. 3.1). Une partie de la colonne vertébrale, le squelette du tronc et les muscles du tronc et des membres se forment à partir des somites, masses cellulaires qui se différencient selon une séquence antéro-postérieure à partir du mésoderme situé de part et d'autre de la chorde. Vers la fin de la gastrulation, l'ectoderme recouvrant la chorde est spécifié en tissu nerveux qui s'enroule pour former le tube neural à partir duquel le cerveau, la moelle épinière et le reste du système nerveux se formeront (Fig. 3.7). La ressemblance générale du plan d'organisation de tous les vertébrés suggère des processus de développement globalement similaires chez ces différents animaux. C'est largement le cas, même s'il existe des différences considérables dans le développement, particulièrement dans les stades les plus précoces.

Les différences dans le développement des organismes modèles, qui seront vues chapitres 4 et 5, concernent surtout les modalités et le moment de la mise en place des axes, et comment s'agencent les feuillets embryonnaires. Ces différences découlent essentiellement des modes divers de reproduction et de la forme des embryons précoces qui en résulte. Le vitellus est la source exclusive de nutriments pour le développement embryonnaire des poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et pour les rares mammifères qui, comme l'ornithorynque, pondent des œufs. Les œufs de la plupart des mammifères, au contraire, sont petits et dépourvus de vitellus, l'embryon étant nourri au cours de ses premiers jours par les fluides de l'oviducte et de l'utérus. Une fois implanté dans la paroi utérine, l'embryon de mammifère développe des membranes extra-embryonnaires spécialisées qui l'entourent, le protègent et à travers lesquelles, via le placenta, il recoit son alimentation de l'organisme maternel. Les embryons d'oiseaux développent eux aussi des membranes extra-embryonnaires pour obtenir les nutriments depuis le vitellus, échanger l'oxygène et le dioxyde de carbone à travers la coquille poreuse de l'œuf et stocker les déchets. Les oiseaux et des mammifères, qui forment une membrane extra-embryonnaire appelée amnios, sont nommés amniotes, alors que les amphibiens et les poissons qui n'en forment pas, sont qualifiés d'anamniotes.

L'étude du développement requiert d'avoir un moyen fiable pour identifier un stade donné et s'y référer. Pour la plupart des espèces, se fier au temps écoulé depuis la fécondation n'est pas satisfaisant étant donnée sa grande variabilité. Les amphibiens, par exemple, se développent relativement normalement dans une large gamme thermique mais leur vitesse de développement diffère en fonction de la température. Les biologistes du développement, par conséquent, divisent le développement embryonnaire normal de chaque espèce en une série de stades numérotés, identifiés davantage d'après leurs caractéristiques principales que par le temps écoulé après la fécondation. Un embryon de xénope de stade 10, par exemple, correspond à un embryon à un stade très précoce de gastrulation, alors que le stade 54 se réfère au têtard totalement développé et doté de membres. Le développement de l'embryon de poulet a été caractérisé de la même façon en stades numérotés qui fournissent un système de datation beaucoup plus précis qu'une chronologie fondée à partir de la ponte de l'œuf. Les embryons de souris, qui se développent dans un environnement beaucoup plus stable, l'organisme maternel, présentent eux aussi une variation considérable de la durée de leur développement, même entre embryons d'une même portée. Le stade des embryons précoces de souris est souvent établi en fonction du nombre de jours depuis la conception, le matin où le bouchon vaginal, formé par le durcissement d'éléments déposés avec le sperme lors de l'accouplement, étant nommé 0,5 jpc, ou E0,5 (jour embryonnaire 0,5). Le nombre de jours post-conception n'est cependant qu'indicatif, et une fois les somites formés, leur nombre peut être utilisé pour indiquer de façon plus fiable le stade du développement. Des liens vers des sites web décrivant les stades des vertébrés modèles choisis ici, sont fournis dans la section « Références bibliographiques générales ».

3.1 Le crapaud *Xenopus laevis* est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation

Bien qu'une grande partie des études ait classiquement été réalisée chez les amphibiens urodèles, comme les tritons, l'espèce la plus communément utilisée pour l'étude du développement est une espèce d'amphibiens anoures, le crapaud à griffe africain Xenopus laevis. Celui-ci est totalement aquatique, et capable de se développer normalement dans l'eau du robinet. Cependant en raison de sa tétraploïdie, les études génétiques tendent de plus en plus à utiliser l'espèce diploïde Xenopus tropicalis (Section 1.6). Tout au long de cet ouvrage, le terme xénope fera référence à l'espèce X. laevis, à moins que le contraire ne soit spécifié. Un grand avantage du xénope tient à l'obtention facile d'œufs fécondés : l'injection de l'hormone chorionique gonadotrope humaine à des mâles et des femelles placés ensemble toute une nuit entraînera leur accouplement. Les centaines d'ovocytes déposés dans l'eau par la femelle seront fécondés par les spermatozoïdes libérés par le mâle. La fécondation peut aussi avoir lieu dans une cuvette en ajoutant des spermatozoïdes à des ovocytes déposés par la femelle suite à une stimulation hormonale. Un avantage de la fécondation artificielle est qu'elle conduit au développement synchrone des embryons et permet ainsi d'obtenir de nombreux embryons au même stade de développement. Les zygotes sont grands (1,2-1,4 mm de diamètre) et assez faciles à manipuler. Les embryons de xénope sont particulièrement robustes et très résistants à l'infection après un acte microchirurgical. Il est également facile de cultiver des fragments d'embryons précoces de xénope dans une solution chimique définie.

Le cycle vital du xénope et ses principaux stades de développement sont résumés Fig. 3.3. L'ovocyte mature du xénope est polarisé, avec une **région animale** noir, pigmenté, et une **région végétative** pâle, riche en vitellus et plus dense (Fig. 3.4). L'axe reliant le pôle animal au pôle végétatif est appelé **axe animal-végétatif**. Avant la fécondation, l'ovocyte est entouré d'une membrane vitelline protectrice, elle-même enveloppée **Fig. 3.3 Cycle de vie du crapaud africain** *Xenopus laevis.* Les stades numérotés font référence aux stades standardisés du développement du xénope. Une liste illustrée peut être trouvée sur le site web Xenbase listé dans la partie « Références bibliographiques générales ». Les photographies montrent : un embryon au stade blastula (en haut, barre d'échelle = 0,5 mm) ; un têtard au stage 41 (au centre, barre d'échelle = 1 mm) et un crapaud adulte (en bas, barre d'échelle = 1 cm).

En haut, photographie aimablement communiquée par J. Slack. au milieu et en bas, photographies aimablement communiquées par J. Smith.







Fig. 3.4 Stade tardif d'ovocyte de xénope. La surface de la moitié animale (en haut) est pigmentée alors que la moitié végétative plus pâle est alourdie par le vitellus. Barre d'échelle = 1 mm.

Photographie aimablement communiquée par J. Smith.

Fig. 3.5 Segmentation d'un embryon de xénope. En haut des schémas montrent le zygote et les trois premières divisions de segmentation en vues de côté. Les globules polaires sont présents au niveau du pôle animal du zygote et au stade deux-cellules. Les photographies en dessous montrent l'œuf de xénope en cours de clivage et sont prises selon des angles différents (voir aussi Fig. 1.14).

Photographies reproduites avec l'autorisation de Kessel, R.G., Shih, C.Y.: Scanning Electron Microscopy in Biology: A Student's Atlas of Biological Organization. London, Springer-Verlag, 1974. © 1974 Springer-Verlag GmbH & Co. par une gangue gélatineuse. À ce stade, la méiose n'est pas encore achevée : la première division de méiose a conduit à la formation d'une petite cellule, un **globule polaire**, au pôle animal, mais la seconde division méiotique ne s'achèvera qu'après la fécondation, avec la formation d'un second globule polaire également au pôle animal (Encart 9A). À la fécondation, un spermatozoïde pénètre dans l'ovule au niveau de la région animale. L'ovocyte achève la méiose, et les pronuclei femelle (issu de l'ovocyte) et mâle (issu du spermatozoïde) fusionnent pour former le noyau diploïde du zygote.

La première division de segmentation du zygote se produit selon l'axe animal-végétatif environ 90 minutes après la fécondation, divisant l'embryon en deux moitiés identiques, droite et gauche (Fig. 3.5). Les divisions suivantes se succèdent rapidement à des intervalles de 30 minutes environ. Le plan de la seconde division contient aussi l'axe animal-végétatif mais forme un angle droit avec le plan de la première division. La troisième division est équatoriale, coupant à 90 degrés les deux plans de division précédents et divisant l'embryon en quatre cellules animales et quatre cellules végétatives plus grosses. Chez le xénope, à ce stade précoce, les cellules ne grossissent pas entre les divisions, et le clivage, en se poursuivant, forme ainsi des cellules de plus en plus petites. Les cellules issues des divisions de segmentation sont souvent appelées **blastomères**. Les divisions sont d'abord synchrones, mais la masse vitelline entravant les divisions, celles-ci se ralentissent dans la moitié végétative de l'embryon riche en vitellus et les cellules de cette région sont plus grandes que celles de la moitié animale. Au sein de cette masse sphérique de cellules, une cavité remplie de liquide, le **blastocœle**, se développe dans la région animale et l'embryon est alors nommé **blastula**.

À l'issue de la formation de la blastula, l'embryon de xénope a subi environ 12 divisions cellulaires et est formé de plusieurs milliers de cellules. La carte des territoires présomptifs à ce stade (Section 1.12) montre que la **zone marginale**, située autour de la partie équatoriale donnera naissance au mésoderme, à l'origine de structures internes, la région végétative donnera naissance à l'endoderme alors que le pôle animal formera l'ectoderme qui couvrira finalement l'intégralité de l'embryon (Fig. 3.6, schéma de gauche).

L'étape suivante correspond à la gastrulation. Au cours de ce stade, les cellules prolifèrent peu, mais d'importants mouvements et réarrangements des feuillets embryonnaires, spécifiés dans la blastula, permettent leur positionnement correct dans le corps. La gastrulation implique, au cours du temps, des mouvements selon les trois dimensions de l'espace, difficiles à visualiser. Le premier signe externe de la gastrulation est la formation d'une petite invagination en forme d'encoche, le **blastopore**, à la surface de la blastula sur le futur côté dorsal (Fig. 3.6, schéma central gauche). La lèvre dorsale du blastopore est d'une importance capitale dans le développement, en étant le **centre organisateur de l'embryon**, nommé **centre organisateur de Spemann** chez les amphibiens, sans lequel n'a pas lieu le développement des structures dorsales et des





structures de l'axe antéro-postérieur. L'expérience célèbre de Hans Spemann et Hilde Mangold qui a conduit à la découverte de ce centre organisateur est décrite Fig. 1.9. Une fois la gastrulation commencée, l'embryon est nommé gastrula. Chez le xénope, les cellules qui formeront l'endoderme et le mésoderme situées au niveau de la zone marginale, pénètrent par le blastopore à l'intérieur de la gastrula sous la forme de feuillets cellulaires cohésifs, par un mouvement d'enroulement sous la lèvre. Ce mouvement est nommé involution. Une fois à l'intérieur, les tissus convergent vers la ligne médiane et s'étendent le long de l'axe antéro-postérieur sous l'ectoderme dorsal, provoquant l'allongement de l'embryon le long de l'axe anrtéro-postérieur. Au même moment, l'ectoderme s'étend vers le bas et couvre en totalité l'embryon au cours d'un processus appelé épibolie. La couche d'endoderme dorsal invaginé s'accole étroitement au mésoderme, laissant entre elle et le vitellus, côté végétatif, un espace nommé archentéron (Fig. 3.6, schéma central droit) qui correspond au précurseur de la cavité du tube digestif.

Le mouvement d'invagination de l'endoderme et du mésoderme commence dorsalement et s'étend latéralement puis ventralement pour former un cercle complet de cellules involuant autour du blastopore (Fig. 3.6, schéma de droite). À la fin de la gastrulation, le blastopore s'est quasiment refermé et la fente persistante formera l'anus. Le mésoderme dorsal se situe maintenant sous l'ectoderme dorsal, le mésoderme latéral et ventral est désormais dans sa position définitive selon le plan d'organisation corporelle, et l'ectoderme s'est étalé et recouvre la totalité du corps de l'embryon. Il reste encore une grande quantité de vitellus, qui fournira les nutriments nécessaires jusqu'à ce que la larve, le têtard, puisse se nourrir. Pendant la gastrulation, le mésoderme de la région dorsale commence à former la chorde et les somites alors que le mésoderme latéral adjacent, formera le mésoderme intermédiaire à partir duquel se développeront les reins, et plus latéralement encore, se trouve le mésoderme des lames latérales dont la partie antérieure sera à l'origine du cœur. Les mouvements cellulaires et tissulaires qui ont lieu au cours de la gastrulation du xénope et d'autres espèces sont présentés en détails Chapitre 9.

La gastrulation est suivie de la **neurulation**, la formation du tube neural, précurseur embryonnaire précoce du système nerveux central. À ce stade, l'embryon est nommé neurula. Le premier signe visible de la neurulation est la formation des replis neuraux sur les bords de la plaque neurale, zone où l'ectoderme épaissi recouvre la chorde. Les replis se soulèvent, convergent vers la ligne médiane et fusionnent ensemble pour former le tube neural qui s'étend sous l'épiderme (Fig. 3.7). Les cellules des crêtes neurales se détachent de la partie supérieure du tube neural, de part et d'autre de la zone de fusion, et migrent dans le corps, pour former des structures variées qui seront décrites Chapitre 5. La partie antérieure du tube neural donnera le cerveau, et plus en arrière, le tube neural recouvrant la chorde donnera naissance à la moelle épinière.

L'embryon commence désormais à ressembler à un têtard avec les principales caractéristiques des vertébrés (Fig. 3.8). À l'extrémité antérieure, le cerveau est déjà divisé

Fig. 3.6 La gastrulation chez les

amphibiens. La blastula (à gauche) contient plusieurs centaines de cellules et abrite une cavité remplie de liquide, le blastocœle. située sous les cellules du pôle animal. La gastrulation commence (au centre à gauche) avec la formation du blastopore, qui se forme sur le côté dorsal de l'embryon. Les futurs mésoderme et endoderme de la zone marginale migrent à l'intérieur par la lèvre dorsale du blastopore, le mésoderme finit entouré par l'endoderme et l'ectoderme dans la région animale (au centre à droite). Les mouvements de tissu créent une nouvelle cavité — l'archentéron — qui deviendra le tube digestif. Le futur endoderme de la région ventrale migre lui aussi à l'intérieur par la lèvre dorsale du blastopore (à droite) et finira de compléter l'archentéron. À la fin de la gastrulation, la taille du blastocœle est considérablement réduite.

Illustration d'après Balinsky, B.I. : An Introduction to Embryology. 4th edition. Philadelphia, W.B. Saunders, 1975.

en plusieurs régions, les yeux et les oreilles ayant commencé à se développer. De chaque côté, se trouvent aussi trois **arcs branchiaux** dont le plus antérieur formera les mâchoires. Plus postérieurement, les somites et la chorde sont bien développés. Chez le xénope, la bouche s'ouvre au stade 40, environ deux jours et demi après la





Fig. 3.7 Neurulation chez les amphibiens. En haut : la plaque neurale forme les replis neuraux au moment où la chorde commence à se former au niveau de la ligne médiane. Au centre et en bas : les bords des replis neuraux se rejoignent dans la partie médiane pour former le tube neural, à partir duquel le cerveau et la moelle épinière se développeront. Au cours de la neurulation, l'embryon s'allonge le long de l'axe antéropostérieur. La colonne de gauche présente les coupes des embryons selon les plans indiqués par les lignes pointillées jaunes de la colonne centrale. La colonne centrale présente des vues de la face dorsale de l'embryon d'amphibien. La colonne de droite présente des sections d'embryon selon des plans précisés par les lignes pointillées vertes dans la colonne centrale. Ce schéma présente la neurulation d'un embryon d'amphibien urodèle à la place du xénope, permettant de visualiser le sillon neural, plus clairement visible dans les embryons d'urodèles.

Fig. 3.8 Stade du bourgeon caudal précoce (stade 26) d'un embryon de xénope. À l'extrémité antérieure, dans la région de la tête, le futur œil est proéminent et la vésicule auditive (vésicule otique), qui se développera en oreille est formée. Le

se développera en oreille, est formée. Le cerveau est divisé en cerveau antérieur (prosencéphale), mésencéphale et cerveau postérieur (rhombencéphale). Juste en arrière du site où se formera la bouche, sont situés les arcs branchiaux, dont le premier formera la mandibule. Plus en arrière, une succession de somites se disposent de chaque côté de la chorde (en marron sur la photographie). Le rein embryonnaire (pronéphros) commence à se former à partir du mésoderme latéral. Ventralement à ces structures se situe le tube digestif (non visible sur ce cliché). Le bourgeon caudal formera la queue du têtard, intégrant un prolongement des somites, du tube neural et de la chorde. Barre d'échelle = 1 mm.

Photographie aimablement communiquée par B. Herrmann. fécondation. La queue du têtard, en position post-anale, est formée plus tard. Elle se développe à partir du **bourgeon caudal**, responsable de l'extension de la chorde, des somites et du tube neural dans la queue. La suite du développement permettra la formation d'organes et tissus variés tels le sang et le cœur, les reins, les poumons et le foie. Une fois achevée la formation des organes, ou **organogenèse**, le têtard se libère de sa gangue gélatineuse, et commence à nager et à se nourrir. Plus tard, la larve de têtard subira une métamorphose pour former le crapaud adulte, avec la queue qui régresse et des membres qui se développent (la métamorphose est présentée Chapitre 13).

3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus

Le poisson-zèbre présente deux sérieux avantages en tant que vertébré modèle pour le développement : son cycle de vie très court, d'environ 12 semaines, qui rend relativement facile une analyse génétique dont un criblage génétique à grande échelle (Encart 3C), et la transparence des embryons qui permet l'observation directe du devenir et des mouvements cellulaires au cours du développement. L'analyse génétique étant possible chez le poisson-zèbre, celui-ci est devenu un organisme modèle utile pour étudier certaines maladies humaines dues à des anomalies génétiques, en particulier des pathologies sanguines ou cardiovasculaires. Le cycle vital est présenté Fig. 3.9. L'ovule de poisson-zèbre a un diamètre d'environ 0,7 mm, et un axe animal-végétatif évident, avec le cytoplasme et le noyau situés au pôle animal, reposant sur une masse importante de vitellus. Après la fécondation, les divisions du zygote ne concernent pas la masse vitelline, si bien qu'un amas de blastomères se retrouve juché sur une masse importante de vitellus. Les plans des cinq premières divisions sont tous verticaux et la première division horizontale donne naissance au stade 64-cellules, environ deux heures après la fécondation (Fig. 3.10).

Les divisions suivantes conduisent au **stade sphère**, au cours duquel l'embryon prend désormais la forme d'un **blastoderme** d'environ 1 000 cellules reposant au-dessus

Fig. 3.9 Cycle de vie du poisson-zèbre. L'embryon de poisson-zèbre se développe en un blastoderme en forme de monticule surmontant une grande cellule vitelline. Il se développe rapidement, et environ deux jours après la fécondation, se produit l'éclosion d'un petit poisson, encore relié à un restant de vitellus. La photographie du haut montre un poisson-zèbre au stade sphère, avec l'embryon reposant sur une volumineuse cellule vitelline (barre d'échelle = 0,5 mm). La photographie du milieu montre un embryon au stade 14 somites, montrant le tronc segmenté qui s'est développé. Sa transparence est utile pour observer le comportement des cellules (barre d'échelle = 0,5 mm). La photographie du bas montre un poisson-zèbre adulte (barre d'échelle = 1 cm). Une liste illustrée des stades du développement du poisson-zèbre peut être trouvée sur le site web référencé dans la partie « Références bibliographiques générales ».

Photographies (haut et milieu) : d'après Boulekbache, 1998 ; (bas) : i-stock/isoft.







Fig. 3.10 La segmentation de l'embryon de poisson zèbre est initialement restreinte à la moitié animale (moitié supérieure) de l'embryon.

Photographies reproduites avec l'autorisation de Kessel, R.G., Shih, C.Y.: Scanning Electron Microscopy in Biology: A Student's Atlas of Biological Organization. London, Springer-Verlag, 1974. © 1974 Springer-Verlag GmbH & Co.

Fig. 3.11 Épibolie et gastrulation chez le poisson-zèbre. À la fin du premier stade de segmentation, environ 4,3 heures après la fécondation, l'embryon de poisson-zèbre est composé d'un amas de blastomères reposant sur le vitellus, séparés du vitellus par une couche plurinucléée de cytoplasme nommée la couche syncytiale vitelline (à gauche). Avec la segmentation qui se poursuit et l'étalement des couches de cellules (épibolie), la moitié supérieure du vitellus se recouvre par un blastoderme doté de bords épaissis, l'anneau germinatif. Une région en forme d'écusson est visible dans le blastoderme sur son côté dorsal (au centre à gauche). La gastrulation a lieu par involution de cellules au niveau d'un anneau entourant la marge du blastoderme (au centre à droite). Les cellules qui involuent convergent au niveau de la ligne médiane dorsale pour former le corps de l'embryon entourant le vitellus (à droite).

de la masse vitelline. Le blastoderme hémisphérique présente une couche externe de cellules aplaties, en une seule assise, nommée **couche enveloppante externe** et une **couche profonde** de cellules plus arrondies à partir desquelles l'embryon se développe (Fig. 3.11). Au début du stade blastoderme, les blastomères situés à la marge du blastoderme fusionnent avec la masse vitelline, formant ainsi une couche continue de cytoplasme multinucléé dépourvu de vitellus située sous le blastoderme et nommée **couche syncytiale vitelline**. Le blastoderme, et la couche syncytiale vitelline s'étendent vers le pôle végétatif par épibolie et recouvrent finalement le vitellus.

Le blastoderme de poisson et la blastula d'amphibien correspondent au même stade de développement, bien que leur morphologie diffère. Chez le poisson, l'endoderme dérive des cellules profondes qui se situent juste à la marge du blastoderme. Cette étroite couche marginale est souvent nommée **endomésoderme** car les descendants d'une cellule donnée de cette région peuvent participer à la formation de l'endoderme ou du mésoderme. Les cellules profondes distantes de 4 à 6 diamètres cellulaires de la zone marginale donnent exclusivement du mésoderme. Ce chevauchement chez le poisson-zèbre entre endoderme et mésoderme présomptifs diffère quelque peu de l'organisation chez le xénope où endoderme et mésoderme occupent des positions plus distinctes. L'ectoderme de l'embryon de poisson, comme celui du xénope, dérive des cellules de la région animale du blastoderme.

Environ 5 h 30 après la fécondation, le blastoderme s'étend à mi-chemin du pôle végétatif, et les cellules de la couche profonde se regroupent pour former un épaississement au bord du blastoderme, constituant l'**anneau germinatif** embryonnaire (Fig. 3.11, schéma central gauche). Au même moment, les cellules de la couche profonde de l'anneau germinatif convergent vers le côté dorsal de l'embryon, formant finalement une région épaissie et compacte en forme de bouclier sur la face dorsale de l'anneau germinatif. L'écusson devient visible environ 6 heures après la fécondation et constitue le **stade de l'écusson**. La région de l'écusson est l'analogue du centre organisateur de Spemann du xénope. La gastrulation fait suite, avec les cellules de l'endomésoderme et du mésoderme qui, en roulant sous le bord du blastoderme dans un processus d'involution, migrent à l'intérieur sous l'ectoderme. Ce mouvement cellulaire de pénétration a lieu sur toute la périphérie du blastoderme à peu près en même temps, les premières cellules qui involuent provenant majoritairement des



marges dorsales et latérales du blastoderme et formant l'endoderme. Lorsque l'endomésoderme s'internalise, l'ectoderme subit toujours l'épibolie et s'étend dans la direction du pôle végétatif jusqu'à recouvrir la totalité de l'embryon, y compris la masse vitelline (détaillé Chapitre 9).

Une fois internalisées dans l'embryon en cours de gastrulation, les cellules de l'endomésoderme migrent sous l'ectoderme vers le pôle animal. Le tissu converge pour former l'axe principal de l'embryon, et étend et allonge l'embryon selon une direction antéro-postérieure, comme chez le xénope. Les futures cellules du mésoderme et de l'endoderme sont alors sous l'ectoderme et pendant que le blastoderme s'étalait aux trois quarts de la distance vers le pôle végétatif, une couche interne de cellules d'endoderme s'est constituée contre le vitellus, les cellules plus superficielles devenant du mésoderme. Vers 9 h, la chorde s'est individualisée au niveau de la ligne médiane dorsale de l'embryon, et l'involution des cellules au niveau de la marge du blastoderme est achevée vers 10 h. Débutent alors la formation des somites, la neurulation et la migration des cellules des crêtes neurales.

Au cours des 12 heures suivantes, l'embryon poursuit son élongation et les ébauches des différents systèmes organiques sont reconnaissables. Les somites apparaissent d'abord à l'extrémité antérieure, vers 10 h 30 environ, à un rythme de un somite toutes les 20 puis 30 minutes, 18 somites étant formés à 18 h. Chez le poisson-zèbre la formation du tube digestif diffère de celle du xénope, du poulet ou de la souris par plusieurs aspects. Le tube digestif commence à se développer à un stade relativement tardif de la gastrulation, au stade 18 somites, et grâce à des réorganisations cellulaires au sein des couches internalisées de l'endoderme, il forme une structure tubulaire.

La neurulation chez le poisson-zèbre commence, comme chez le xénope, vers la fin de la gastrulation avec la formation de la plaque neurale, zone épaissie d'ectoderme qui surmonte la chorde. Mais contrairement au xénope, l'intégralité de la plaque neurale du poisson-zèbre forme d'abord une tige cellulaire pleine avant de se creuser d'une cavité pour former le tube neural. Le système nerveux se développe rapidement. Les vésicules optiques, qui donneront les yeux, peuvent être identifiées à 12 h sous forme de saillies sur le cerveau, et vers 18 h le corps commence à bouger. À 48 h se produit l'éclosion et le jeune poisson commence à nager et à se nourrir.

3.3 Les oiseaux et les mammifères se ressemblent et diffèrent du xénope pour certains aspects importants du développement précoce

Avant de décrire séparément le déroulement du développement des embryons de poulet et de souris, il peut être utile de faire ressortir quelques caractéristiques qui les différencient du xénope. La première concerne la forme de l'embryon précoce. La structure aviaire ou mammalienne correspondant à la blastula sphérique d'amphibien juste avant la gastrulation n'est pas une blastula creuse mais un feuillet épithélial appelé épiblaste. La deuxième différence réside dans le fait qu'à ce stade, l'épiblaste ne présente pas de régions contiguës distinctes correspondant aux futurs ectoderme, endoderme et mésoderme. Le moment de la spécification des feuillets embryonnaires est assez différent de ce qui se produit chez le xénope. Ceci sera détaillé dans les chapitres suivants. De plus, alors que la prolifération cellulaire est limitée au cours de la gastrulation chez le xénope, elle est importante dans l'épiblaste du poulet et de la souris, avant et pendant la gastrulation, provoquant à ce stade des mélanges de cellules. La troisième différence tient au fait que le processus de gastrulation qui conduit à l'internalisation de l'endoderme et du mésoderme et à l'organisation des feuillets embryonnaires est assez différent en apparence de celui du xénope. L'internalisation des cellules se fait le long d'un sillon droit, la ligne primitive, et non par un blastopore circulaire.

La ligne primitive chez la souris ou le poulet est l'équivalent du blastopore de l'amphibien. Plus facilement visible sur l'épiblaste plat de l'embryon de poulet, elle peut être vue sur la photographie du haut de la Fig. 3.14. Lors de la gastrulation, les cellules épiblastiques convergent au niveau de la ligne primitive, qu'elles franchissent individuellement, s'étalant sous la surface pour former une couche inférieure d'endoderme et une couche intermédiaire de mésoderme (Fig. 3.12). La spécification des cellules en tant qu'endoderme ou mésoderme a lieu lors de leur passage à travers la



Film montrant l'épibolie chez le poisson zèbre

Fig. 3.12 Immigration du mésoderme et de l'endoderme au cours de la gastrulation de l'embryon de poulet.

Au cours de la gastrulation, les futures cellules du mésoderme et de l'endoderme migrent à l'intérieur du blastoderme, à partir de l'épiblaste, par la ligne primitive. Un épaississement de cellules, nommé nœud de Hensen, se forme à l'extrémité antérieure de la ligne. Au fur et à mesure que la ligne s'étend, des cellules de l'épiblaste migrent vers la ligne primitive (flèches), et pénètrent sous la surface et sont à l'origine du mésoderme et de l'endoderme. Ce dernier en s'individualisant repousse de chaque côté de l'axe médian une couche inférieure de cellules appelée endoblaste. Les cellules restant sur l'épiblaste formeront l'ectoderme.

D'après Balinsky B. I., et al. 1975. An introduction to embryology, 4th edn. W.B. Saunders.



Fig. 3.13 La structure d'un œuf de poule au moment de la ponte. Le clivage commence après la fécondation, alors que l'œuf est encore dans l'oviducte. L'albumen (blanc d'œuf) et la coquille sont ajoutés au cours du passage de l'œuf dans l'oviducte. Au moment de la ponte, l'embryon est un blastoderme à l'allure de disque reposant sur une masse importante de vitellus, qui est entourée par le blanc d'œuf et la coquille. Les chalazes torsadées sont interprétées comme étant des balanciers permettant de soutenir le jaune.



ligne primitive et les cellules restant en surface deviennent ectodermiques. Puisqu'à ce stade l'épiblaste d'oiseau ou de mammifère prend une forme générale de feuillet, cette première phase de gastrulation ne forme pas directement une cavité digestive comme dans le cas de la gastrula sphérique de xénope. Le tube digestif est formé plus tard, par des replis des bords latéraux de l'embryon, entraînant la formation d'une cavité digestive intégralement entourée par des couches d'endoderme, mésoderme et ectoderme. Un retour au poulet va permettre maintenant de détailler le déroulement de son développement.

3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus

Les embryons d'oiseaux sont, dans leur complexité morphologique et le déroulement général du développement embryonnaire, semblables à ceux des mammifères, mais plus faciles à obtenir et à observer. De nombreuses observations peuvent être faites simplement en ouvrant une fenêtre dans la coquille, et les embryons peuvent même être cultivés hors de l'œuf. Ces caractéristiques rendent l'embryon d'oiseau particuliè-rement adapté pour des manipulations de microchirurgie expérimentale, le traçage de lignées cellulaires par injection de marqueurs et la recherche des effets de l'introduction de gènes ou d'autres traitements (Section 3.8). Bien que les formes des embryons de poulet et de souris soient très différentes aux stades précoces du développement précédant la gastrulation (Fig. 3.2), la gastrulation et le développement ultérieur sont très similaires chez ces deux organismes et les études de leurs embryons sont complémentaires. L'embryon précoce de poulet aplati a une forme similaire à celle de l'embryon humain (Fig. 3.2) et la topologie du développement embryonnaire précoce humain est ainsi plus facilement comparable à celui du poulet qu'à celui de la souris qui a une forme de coupe.

L'ovule, gros, et riche en vitellus, est fécondé et le zygote, encore dans l'oviducte de la poule, commence à subir la segmentation ou clivage. Du fait de l'importante masse de vitellus, celle-ci n'affecte qu'une petite partie du cytoplasme du zygote, de quelques millimètres de diamètre, contenant le noyau et située au-dessus de la masse vitelline. La segmentation, lors du passage dans l'oviducte, est à l'origine d'un disque de cellules appelé **blastoderme** ou **blastodisque**. Pendant les 20 heures de transit dans l'oviducte, l'œuf s'entoure de l'albumen extracellulaire (le blanc d'œuf), des membranes coquillières et de la coquille (Fig. 3.13). Au moment de la ponte, le blastoderme, analogue de la blastula précoce d'amphibien, est composé de quelque 32 000-60 000 cellules. Le cycle du poulet est présenté Fig. 3.14.

Les premiers sillons de segmentation se font depuis la surface du cytoplasme mais la cellularition n'est pas totale, les faces ventrales des cellules restant au début ouvertes







sur le vitellus. La région centrale du blastoderme, sous laquelle se développe une cavité nommée **blastocœle primaire** translucide, est nommée **aire pellucide**, en comparaison avec la région plus externe et plus foncée, nommée **aire opaque** (Fig. 3.15). Une couche de cellules, l'hypoblaste, se développe sur le vitellus pour former le plancher de la cavité. L'hypoblaste donne finalement naissance aux structures extra-embryonnaires telles celles reliant l'embryon à sa source de nutriments constituée par le vitellus. L'embryon proprement dit est formé par la couche supérieure du blasto-derme, nommée épiblaste.

La première structure morphologique qui annonce la polarité antéro-postérieure de l'embryon de poulet est un bourrelet de petites cellules en forme de croissant appelé le **croissant de Koller**, situé à la limite entre les aires opaque et pellucide à l'extrémité postérieure de l'embryon. Le croissant de Koller définit la position de la future ligne primitive et la région de l'épiblaste immédiatement adjacente au croissant est nommée **zone marginale postérieure**. La ligne primitive est d'abord visible comme une région plus dense qui s'étend ensuite peu à peu en une bande étroite à mi-chemin sur la zone pellucide, formant finalement un sillon sur la face dorsale de l'épiblaste (Fig. 3.12).

La prolifération cellulaire et la croissance de l'embryon de poulet, contrairement au xénope, continuent pendant la gastrulation. Les cellules épiblastiques convergent vers la ligne primitive, et alors que la ligne se déplace vers l'avant à partir de la zone marginale postérieure, les cellules du sillon s'enfoncent et se répandent à l'avant et sur les côtés sous la couche supérieure, formant une couche de cellules peu cohésives, ou mésenchyme, dans la cavité blastocœlienne (Fig. 3.12 et 3.15). La ligne primitive est alors analogue à la région du blastopore des amphibiens, à la différence que ses cellules migrent à l'intérieur individuellement et non en tant que feuillet cohésif. Cette migration interne est nommée immigration ou *ingression*. Les cellules migrantes donnent naissance au mésoderme et à l'endoderme alors que les cellules restant à la surface de l'épiblaste donneront l'ectoderme. Fig. 3.14 Cycle de vie du poulet. L'ovocyte est fécondé dans la poule et, au moment où le zygote est pondu, le clivage est terminé et un blastoderme cellulaire repose sur le vitellus. Le début de la gastrulation est marqué par l'apparition de la ligne primitive au niveau de la zone marginale postérieure de l'aire pellucide. Le nœud de Hensen se développe à l'extrémité antérieure de la ligne, qui commence alors à régresser, accompagnée par la formation des somites. Les photographies montrent : en haut, la ligne primitive (colorée en marron par un anticorps dirigé contre la protéine Brachyury) entourée par l'aire pellucide (barre d'échelle = 1 mm); au milieu, embryon au stade 14, 50-53 heures après la ponte avec 22 somites (la région de la tête est bien définie et l'organe transparent adjacent est la torsade ventriculaire du cœur (barre d'échelle = 1 mm) ; en bas, embryon au stade 35, environ 8,5-9 jours après la ponte, avec un œil bien développé et un bec (barre d'échelle = 10 mm). Une liste descriptive des stades numérotés (stades de Hamilton et Hamburger) du développement du poulet est disponible sur le site web référencé dans la partie « Références bibliographiques générales ».

Photographie du haut aimablement communiquée par B. Herrmann et reproduite avec l'autorisation de Kispert, A., et al. : **The chick brachyury gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin.** Dev. Biol. 1995, **168** : 406–415. Fig. 3.15 Segmentation et formation de l'épiblaste dans l'embryon de poulet. Au moment où l'œuf est pondu, le clivage n'a affecté qu'une petite partie du cytoplasme de l'œuf, dépourvue de vitellus, pour former un blastoderme en forme de disque. La colonne de gauche montre la vue de dessus d'un embryon, tandis que celle de droite présente des sections transversales à travers l'embryon. Les premiers sillons de segmentation s'enfoncent depuis la surface du cytoplasme du zygote et initialement ne séparent pas totalement le blastoderme du vitellus. Dans le blastoderme cellulaire, la zone centrale surmontant la cavité sousgerminale qui correspond au blastocœle, est appelée aire pellucide et la région marginale est appelée aire opaque. Une couche de cellules recouvre le vitellus en se développant et forme l'hypoblaste. Ce dernier donnera naissance à des structures extra-embryonnaires, tandis que les couches supérieures du blastoderme, formant l'épiblaste, donnent naissance à l'embryon. La ligne primitive du poulet initie sa formation alors que l'hypoblaste est déplacé en avant de la zone marginale postérieure par une nouvelle couche de cellules nommée endoblaste, qui croît depuis cette zone. Les cellules de l'épiblaste migrent en direction de la ligne primitive (flèches vertes), la traversent puis s'étendent sous la surface pour donner naissance au mésoderme et à l'endoderme en interne, ce dernier refoulant l'endoblaste.



La ligne primitive de l'embryon de poulet achève son extension 16 heures après la ponte de l'œuf. À son extrémité antérieure se trouve un bourrelet de cellules, le **nœud de Hensen**, d'où les cellules migrent aussi vers l'intérieur. Le nœud de Hensen est un centre organisateur majeur pour l'embryon précoce de poulet, équivalent au centre organisateur de Spemann des amphibiens.

La taille définitive de la ligne primitive étant atteinte, quelques cellules du nœud de Hensen commencent à migrer vers l'avant, le long de la ligne médiane sous l'épiblaste pour constituer le **mésoderme préchordal** et le **processus céphalique**. Le processus céphalique correspond à l'émergence de la chorde, et le mésoderme préchordal est une masse de cellules non cohésives à l'avant de celle-ci. Une fois le processus céphalique formé, la ligne primitive commence à régresser et le nœud de Hensen recule vers l'extrémité postérieure de l'embryon (Fig. 3.16). Avec la régression du nœud, la chorde en continuité du processus céphalique se met en place dans son sillage, le long de la ligne médiane dorsale du tronc de l'embryon. Lors de la mise en place de la chorde, le mésoderme adjacent commence à former les somites. La formation des somites et l'allongement du corps sont détaillés Chapitre 5. La première paire



de somites est formée environ 24 h après la ponte et les suivantes à un rythme de une toutes les 90 minutes. Le mésoderme immédiatement latéral aux somites est le mésoderme intermédiaire à l'origine des reins, la partie un peu plus latérale nommée mésoderme des lames latérales donnera le système vasculaire et le sang (Fig. 3.17). La partie médiane des somites et la moelle épinière troncale sont produites progressivement avec l'allongement de l'embryon, par une région constituée de cellules apparentées à des cellules-souches, la **zone souche**. Celle-ci est située dans l'épiblaste, de part et d'autre de la ligne primitive, juste après le nœud de Hensen. Les éléments restants du nœud et la zone souche participeront plus tard à la constitution du bourgeon caudal donnant la queue post-anale.

Alors que la chorde se forme, le tissu neural débute son développement, d'abord par la plaque neurale, visible au début comme une région épaissie de l'ectoderme surplombant la chorde. La plaque neurale se replie vers le haut et vers l'intérieur, si bien que ses deux côtés entrent en contact puis fusionnent le long de la ligne médiane dorsale pour former le tube neural, initialement ouvert à ses extrémités antérieure et postérieure. Le tube neural ainsi refermé et recouvert par l'épiderme est présenté sur une coupe d'embryon de poulet (Fig. 3.18).

Juste après la formation du processus céphalique et le début de la régression du nœud de Hensen, les trois feuillets embryonnaires de la région de la tête commencent à se replier ventralement pour former le repli céphalique (Fig. 3.16, schéma central gauche). Celui-ci délimite une poche bordée par l'endoderme à partir de laquelle le pharynx et l'œsophage se formeront (Fig. 3.17, en haut). À la fin, un repli similaire apparaît à l'extrémité caudale pour définir le colon. De plus, les côtés de l'embryon se replient ensemble pour former le reste du tube digestif qui restera ouvert au milieu seulement (région ombilicale), le mésoderme et l'ectoderme formant par la suite la paroi ventrale. Cet événement morphogène clé est nommé fermeture ventrale. Alors que ce repli se forme, les deux ébauches cardiaques apparues de chaque côté se rejoignent dans le plan médian pour former un organe ventral par rapport à l'intestin (Chapitre 11). Deux jours seulement après la ponte, l'embryon a atteint le stade 22 somites, sa tête est bien développée, les vésicules optiques et les fentes auditives présentes et le cœur et les vaisseaux formés (Fig. 3.14, photographie du milieu). Les vaisseaux sanguins et les îlots sanguins où sont générées les premières cellules sanguines, se sont formés dans les tissus extra-embryonnaires. Les vaisseaux se connectent avec ceux de l'embryon pour assurer la circulation, avec un cœur qui bat. À ce stade, l'embryon commence à se tourner sur son côté et, une flexion de la tête fait que l'œil droit est proéminent vers la coquille.

Vers 3-3 jours et demi après la ponte, 40 somites sont formés, la tête avec deux yeux proéminents est alors bien plus développée, et les membres commencent à se former (Fig. 3.19). À 4 jours après la ponte, les membranes extra-embryonnaires sont développées et assurent, à partir du vitellus, l'apport nutritif et la protection de l'embryon

Fig. 3.16 Régression du nœud de Hensen. Une fois que la ligne primitive a atteint la moitié du blastoderme, le nœud de Hensen apparaît au niveau de l'extrémité antérieure. La ligne primitive commence alors à régresser et le nœud de Hensen migre vers l'arrière alors que le repli céphalique et la plaque neurale commencent à se former dans sa partie antérieure. Alors que le nœud se déplace en arrière, la chorde se développe à son avant. Les somites commencent à se former de chaque côté de la chorde et la moelle épinière est progressivement mise en place dans l'ectoderme sus-jacent. La partie médiane des somites et la moelle épinière se forment progressivement à partir d'une zone souche de l'épiblaste, de chaque côté de la ligne, immédiatement en arrière du nœud.

Fig. 3.17 Développement du tube neural et du mésoderme chez l'embryon de poulet.

Une fois la chorde formée, la neurulation débute depuis la partie antérieure vers la partie postérieure. La figure montre une série de coupes le long de l'axe antéro-postérieur d'un embryon de poulet. La formation du tube neural est bien avancée à son extrémité antérieure (les deux coupes du haut), et le repli céphalique sépare déjà la future tête du reste du blastoderme, le repli de la partie ventrale ayant accolé les deux bords de l'endoderme pour former le tube digestif. Au cours de la neurulation, la plague neurale change de forme : les replis neuraux se redressent de chaque côté et forment un tube en fusionnant au niveau de la ligne médiane. Le mésenchyme de cette région participera à la formation de la tête. Dans la partie plus postérieure (coupes du milieu), dans la future région du tronc de l'embryon, la chorde et les somites sont formés et la neurulation débute. À l'extrémité postérieure, sous le nœud de Hensen, (coupe du bas), la formation de la chorde, la formation des somites et la neurulation n'ont pas encore débuté. Le mésoderme internalisé au niveau de la ligne primitive commence à former les structures adéquates en fonction de leur position le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Par exemple, dans la future région du tronc, le mésoderme intermédiaire formera les parties mésodermiques des reins et le mésoderme splanchnique antérieur formera le cœur. Le repliement du corps se poursuit sur toute la longueur de l'embryon, formant l'intestin, et les ébauches d'organes pairs qui se forment initialement de chaque côté de la ligne médiane (par exemple ceux du cœur et de l'aorte dorsale) pour former les organes définitifs en position ventrale par rapport à l'intestin. Les îlots sanguins, à partir desquels les premières cellules sanguines sont produites, se forment à partir de la partie la plus ventrale du mésoderme latéral.

Illustration d'après Patten, B.M.: Early Embryology of the Chick. *New York, Mc Graw-Hill,* 1971.



Fig. 3.18 Micrographie électronique à balayage montrant les somites précoces et le tube neural chez le poulet. Les blocs de somites sont visibles à proximité du tube neural, avec la chorde située juste en dessous. Le mésoderme des lames latérales flanque les somites. Barre d'échelle = 0,1 mm.

Photographie aimablement communiquée par J. Wilting.



(Fig. 3.20). L'amnios entoure un sac amniotique rempli de liquide dans lequel se trouve l'embryon, ce qui lui assure une protection mécanique. Le **chorion** s'étend à l'extérieur de l'amnios juste sous la coquille, l'**allantoïde** reçoit les produits d'excrétion et constitue le site d'échanges en dioxygène et dioxyde de carbone, enfin la **vésicule vitelline** contient le vitellus. Environ 9 jours après la ponte, l'embryon est très bien développé, les ailes, les pattes et le bec sont formés (Fig. 3.14, photographie du bas). Jusqu'à l'éclosion, l'embryon accroît sa taille, les organes internes achèvent leur développement et les plumes naissent sur les ailes et le corps de l'animal. L'éclosion du poussin a lieu 21 jours après la ponte de l'œuf. Une image d'embryon de caille vivant à l'intérieur de l'œuf est obtenue par imagerie par résonance magnétique Fig. 3.31.

3.5 Le zygote de souris est dépourvu de vitellus et son développement précoce implique des cellules dédiées à la formation du placenta et des membranes extra-embryonnaires

Le cycle de développement de la souris dure 9 semaines, de la fécondation à l'adulte mature (Fig. 3.21). Ce cycle relativement court pour un mammifère facilite l'analyse génétique, et est une des raisons pour lesquelles la souris est devenue le principal organisme modèle pour le développement des mammifères. La souris a été le premier mammifère après l'Homme à avoir son génome complet séquencé. Comme pour les quatre organismes modèles, la connaissance issue du séquençage du génome permet de déterminer les profils des gènes exprimés à un stade particulier du développement (Encart 3B). La souris est surtout utile pour l'étude des fonctions géniques car il est assez facile de produire des souris avec un génome particulier à l'aide de techniques transgéniques (Section 3.10), et des souris avec certains gènes complètement inactivés ou *knocked out.*

Les ovules de souris d'environ 80-100 µm de diamètre, sont beaucoup plus petits que ceux de poulet ou de xénope, et dépourvus de vitellus. L'ovocyte libéré par l'ovaire passe dans l'oviducte entouré d'un manteau externe protecteur, la zone pellucide, riche en mucopolysaccharides et glycoprotéines. La fécondation est interne et a lieu dans l'oviducte. La méiose s'achève alors et le second globule polaire se forme (Encart 10A). La segmentation commence lorsque le zygote est encore dans l'oviducte. Les premières divisions sont très lentes comparées à celles du xénope ou du poulet, la première ayant lieu 24 h après la fécondation, la seconde 20 h plus tard et les suivantes à 12 h d'intervalle environ. La segmentation conduit à une sphère dense de cellules, ou blastomères, appelée morula (Fig. 3.22). Au stade 8-cellules, les blastomères augmentent leur surface de contact les uns avec les autres lors d'un processus nommé compaction. Après la compaction, les cellules ont acquis une polarité, leur face externe porte des microvillosités alors que leur face interne est lisse. Les divisions suivantes sont assez variables à la fois radiaires et tangentielles de sorte qu'au stade équivalent au stade 32-cellules, la morula contient environ 10 cellules internes et plus de 20 cellules périphériques.

Chez les jeunes embryons de mammifères, les temps de division cellulaire varient selon le moment et le lieu du développement. Les deux premiers cycles de division font environ 24 h et les suivants durent environ 10 h. Après l'implantation, les cellules épiblastiques prolifèrent rapidement et celles situées à l'avant de la ligne primitive se divisent en seulement 3 h.

Un trait particulier du développement des mammifères est que les divisions précoces génèrent deux populations cellulaires distinctes, le trophectoderme et la





Fig. 3.19 Stade 40-somites d'un embryon de poulet. Le développement de la région céphalique et du cœur est relativement bien avancés, les ailes et les pattes étant présentes sous la forme de petites protrusions.

Fig. 3.20 Les structures extraembryonnaires et la circulation de

l'embryon de poulet. Un embryon de poulet à 4 jours d'incubation est présenté *in situ*. L'embryon repose au sein de la cavité amniotique remplie de liquide et entourée par l'amnios, formant ainsi une chambre protectrice pour l'embryon. Le vitellus est entouré par la membrane de la vésicule vitelline. La veine vitelline prélève les nutriments contenus dans la vésicule vitelline en direction de l'embryon et le sang est renvoyé à celle-ci par l'artère vitelline. L'artère ombilicale véhicule les déchets en direction de l'allantoïde et la veine ombilicale fournit le dioxygène à l'embryon. Les artères sont présentées en rouge et les veines en bleu mais cela ne reflète pas l'état d'oxygénation du sang qu'elles transportent. Au fur et à mesure de la croissance de l'embryon, la cavité amniotique s'agrandit ; l'allantoïde s'accroît aussi et sa couche extérieure fusionne avec le chorion, structure membranaire située sous la coquille, tandis que la vésicule vitelline régresse. Noter que dans ce schéma, l'allantoide a été agrandie afin de rendre bien visibles les vaisseaux ombilicaux.

D'après Patten, B.M. : 1951







Fig. 3.21 Cycle de vie de la souris. L'ovocyte est fécondé dans l'oviducte, où se produit aussi la segmentation, avant l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine, 5 jours après la fécondation. La gastrulation et l'organogenèse se déroulent sur une période de 7 jours et les 6 jours restant avant la naissance sont principalement dédiés à la croissance générale. Après la gastrulation, l'embryon subit un mouvement complexe appelé retournement au cours duquel il s'entoure de ses membranes (non présentées ici). Les photographies présentent (de haut en bas) : un œuf fécondé de souris juste avant la première division de segmentation (barre d'échelle = $10 \mu m$); la vue antérieure d'un embryon de souris au stade E8 (barre d'échelle = 0,1 mm) et un embryon de souris au stade E14 (barre d'échelle = 1 mm). Une liste illustrée des stades au cours du développement de la souris est disponible sur le site web indiqué dans la section "Références bibliographiques générales".

Photographie du haut reproduite avec l'autorisation de Bloom, T.L. : **The effects** of phorbol ester on mouse blastomeres: a role for protein kinase C in compaction ? Development 1989, **106** : 159-171. Photographies aimablement communiquées par N. Brown (au milieu) et J. Wilting (en bas).



masse cellulaire interne. Le trophectoderme est issu des cellules externes de l'embryon et donnera les structures extra-embryonnaires tel le **placenta**, par lequel l'embryon puise sa nourriture à partir de l'organisme maternel. L'embryon proprement dit se développe à partir d'une fraction des cellules internes formant la masse cellulaire interne. À ce stade, l'embryon de mammifère (E3,5 pour la souris) est nommé **blastocyste** (Fig. 3.21). Le liquide pompé par le trophectoderme à l'intérieur du blastocyste conduit à l'expansion du trophectoderme et à la formation d'une cavité remplie de liquide, le blastocœle, et contenant la masse cellulaire interne à l'une de ses extrémités.

De E3,5 à E4,5, la masse cellulaire interne se divise en deux régions. La couche superficielle en contact avec le blastocœle devient l'**endoderme primitif** et contribuera aux membranes extra-embryonnaires, alors que le reste de la masse cellulaire interne formera l'embryon proprement dit ainsi que quelques éléments extra-embryonnaires. À ce stade, vers E4,5, le blastocyste est libéré de la zone pellucide et s'implante dans la paroi utérine.

Le déroulement du développement précoce post-implantatoire de l'embryon de souris de E4,5 jusqu'à E8,5 semble plus complexe que celui du poulet, en raison d'une part de la nécessité de produire un plus grand nombre de membranes extra-embryonnaires et d'autre part de la forme en coupelle que l'épiblaste prend dans les premiers stades. C'est une particularité des embryons de souris et des autres rongeurs. Les embryons humains ou ceux de lapin, par exemple, sont des blastodisques plats, beaucoup plus semblables à celui du poulet. Cependant, malgré cette topologie différente, la gastrulation et les stades ultérieurs du développement de l'embryon de souris sont en somme très similaires à ceux du poulet.

Les deux premiers jours du développement post-implantatoire de la souris sont présentés Fig. 3,23. Après l'adhérence du blastocyste à l'épithélium utérin, les cellules du **trophectoderme mural**, la région opposée à la masse cellulaire interne, répliquent leur ADN sans division, générant les cellules géantes du **trophoblaste primaire** qui



envahissent la paroi utérine et entourent la majeure partie du conceptus, formant une interface avec les tissus maternels. La paroi utérine enveloppe le blastocyste, et les cellules du **trophectoderme polaire**, recouvrant la masse cellulaire interne, continuent de se diviser, formant le cône ectoplacentaire et l'**ectoderme extra-embryonnaire**, tous deux contribuant à la formation du placenta.

Les cellules externes au cône ectoplacentaire se différencient en cellules géantes du trophoblaste secondaire. Des cellules de l'endoderme primitif migrent pour couvrir l'intégralité de la surface interne du trophectoderme mural et constituent l'endoderme pariétal donnant finalement la membrane de Reichert, couche de cellules et de matrice extracellulaire ayant une fonction de barrière. Les cellules restantes de l'endoderme primitif forment l'endoderme viscéral, qui couvre l'œuf-cylindre en élongation contenant l'épiblaste.

Vers E5,5, une cavité interne s'est formée à l'intérieur de l'épiblaste prenant la forme d'une coupelle et apparaissant en forme de U en section transversale (Fig. 3.23, les deux schémas centraux). L'épiblaste est alors formé d'une seule couche épithéliale

Fig. 3.22 Segmentation de l'embryon de souris. Les clichés montrent le clivage

d'un œuf fécondé de souris depuis le stade 2-cellules jusqu'à la formation du blastocyste. Après le stade 8-cellules, la compaction a lieu, conduisant à la formation d'une sphère pleine de cellules nommée morula, au sein de laquelle les contours individuels des cellules ne peuvent plus être discernés nettement. Les cellules internes de la morula donnent naissance à la masse cellulaire interne, correspondant à la masse compacte au sommet du blastocyste. C'est à partir de ces cellules que l'embryon proprement dit se forme. La couche externe du blastocyste, le trophectoderme, donne naissance à des structures extra-embryonnaires.

Photographies aimablement communiquées par T. Fleming.



Fig. 3.23 Développement précoce pré-implantatoire de

l'embryon de souris. À gauche : avant l'implantation, l'œuf fécondé a subi une segmentation permettant de former un blastocyste creux, au sein duquel un petit groupe de cellules, la masse cellulaire interne (en bleu), donnera naissance à l'embryon, tandis que le reste de l'embryon formera le trophectoderme, donnant naissance à des structures extraembryonnaires. Au moment de l'implantation, la masse cellulaire interne est constituée de deux régions : l'épiblaste qui constitue l'embryon proprement dit et l'endoderme primitif, qui contribuera aux structures extra-embryonnaires. Schéma central gauche : le trophectoderme mural donne les cellules géantes du trophectoderme, qui envahiront la paroi utérine, participant à l'ancrage du blastocyste en son sein. Le blastocyste devient entouré par la paroi utérine. Le trophectoderme polaire, en contact avec l'épiblaste, prolifère et forme des tissus extra-embryonnaires, le cône ectoplacentaire et l'endoderme extra-embryonnaire, qui contribueront au placenta. L'épiblaste s'allonge et forme une cavité interne (cavité proamniotique), ce qui lui donnera sa forme en coupelle. Schéma central droit : la structure cylindrique contenant à la fois l'épiblaste et le tissu extra-embryonnaire dérivé du trophectoderme polaire est appelée œuf-cylindre. À droite : le début de la gastrulation est marqué par la formation de la ligne primitive (marron) à l'arrière de l'épiblaste (P). Elle commence à s'étendre vers l'avant (flèche) jusqu'à la base du cylindre. Par simplification, l'endoderme pariétal et les cellules trophoblastiques géantes ne sont pas représentés dans ce schéma ni dans les figures suivantes. A, partie antérieure ; P, partie postérieure.

Illustration d'après Hogan, B., et al. : Manipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual, *2nd edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.*

Fig. 3.24 Gastrulation chez l'embryon de

souris. À gauche : comme pour le poulet, la gastrulation de l'embryon de souris commence quand les cellules de l'épiblaste convergent vers la zone postérieure de l'épiblaste et migrent sous la surface, formant la ligne primitive plus dense (en brun) au niveau de laquelle les cellules sont internalisées. Une fois à l'intérieur, les cellules en prolifération progressent latéralement entre l'épiblaste et l'endoderme viscéral pour former la couche du futur mésoderme (en brun clair). Certaines des cellules internalisées remplaceront finalement l'endoderme viscéral pour donner l'endoderme définitif (non présenté ici sur le schéma par souci de simplification) qui formera le tube digestif. À droite : au cours de la gastrulation, la ligne primitive s'allonge et atteint la base de la coupelle, avec le nœud situé à l'extrémité antérieure. Les cellules du nœud migrent vers l'avant pour former la chorde dans la région céphalique, correspondant au processus céphalique. Une partie de l'endoderme viscéral et du mésoderme n'est pas représentée dans ce schéma pour laisser visibles le nœud et la chorde. Étant donnée la topologie de l'embryon de souris à ce stade, les feuillets embryonnaires apparaissent inversés (l'ectoderme recouvre la face interne de la coupelle, l'endoderme est sur la face externe) comparés à la gastrula de grenouille.

Illustration avec l'autorisation de McMahon, A.P. : **Mouse development. Winged-helix in axial patterning.** Curr. Biol. 1994, **4** : 903–906.



incurvée, qui contient à ce stade environ 1 000 cellules, et à partir de laquelle l'embryon se développe. Le premier signe visible qui marque le futur axe antéro-postérieur de l'embryon est l'apparition de la ligne primitive vers E6,5. La ligne débute comme un épaississement restreint à la marge de la coupe, sur un de ses côtés qui correspondra à la future extrémité postérieure de l'embryon. Le développement initial de la ligne primitive chez la souris est semblable à celui du poulet. Au cours des 12-24 heures suivantes, elle s'allonge jusqu'à atteindre la base de la coupe. Là, une concentration de cellules, le **nœud**, se distingue à l'extrémité antérieure de la ligne en extension et correspond au nœud de Hensen de l'embryon de poulet. Imaginer que la coupelle formée par l'épiblaste soit étalée, facilite la comparaison de la formation de la ligne primitive avec celle du poulet. (Fig. 5.12). Comme chez le poulet, lors de la gastrulation de la souris, les cellules épiblastiques migrent vers la ligne primitive et les cellules en prolifération la traversent pour se répandre latéralement et vers l'avant entre l'ectoderme et l'endoderme viscéral pour former un feuillet mésodermique (Fig. 3.24).

Quelques cellules dérivant de l'épiblaste traversent la ligne et entrent dans l'endoderme viscéral, le déplaçant peu à peu pour former l'**endoderme embryonnaire** définitif à l'extérieur de la coupelle, correspondant à la future face ventrale de l'embryon. Le développement de E7,5 à E10,5 est présenté Fig. 3.25. Les cellules migrant vers l'avant depuis le nœud forment le mésoderme de la plaque préchordale et le processus céphalique. La prolifération cellulaire se poursuit durant la gastrulation, avec une croissance rapide de la partie en avant du nœud, l'ectoderme de cette partie formant la plaque neurale antérieure. Comme pour le poulet, lorsque la ligne régresse, la chorde troncale se met peu à peu en place, la moelle épinière se développant au dessus et les somites de chaque côté. Les cellules donnant la moelle épinière et les parties médianes des somites sont formées par l'épiblaste de chaque côté de la ligne antérieure, qui joue un rôle de zone souche. Celle-ci contribue finalement à la formation du bourgeon caudal donnant naissance à la queue post-anale.

La formation des somites et l'organogenèse débutent à l'extrémité antérieure de l'embryon de souris et se poursuivent vers l'arrière. Le premier somite apparaît vers E7,5 et les suivants sont formés toutes les 120 minutes. Vers E8, la tête est apparente et les replis neuraux commencent à se former sur la face dorsale (Fig. 3.25). L'endoderme embryonnaire, exposé à la face ventrale de l'embryon au début, s'enfonce pour former les intestins antérieur et postérieur, les faces latérales fusionnant finalement pour complètement enfoncer l'intestin à l'intérieur. La croissance subséquente du mésoderme et de l'ectoderme permet la formation de la paroi ventrale du corps au cours du processus de la fermeture du ventre. Le cœur et le foie se déplacent vers leur site définitif par rapport au tube digestif.


Fig. 3.25 Vues schématiques du développement précoce de l'embryon de souris jusqu'à la fin de la gastrulation et de la neurulation. À gauche : vers E7,5, la ligne primitive (en brun) s'est étendue jusqu'à l'extrémité de l'épiblaste et le nœud est formé. L'ectoderme antérieur (en bleu) devient la plaque neurale antérieure, qui donnera naissance au cerveau. Le mésoderme est coloré en brun clair. Schéma central gauche : la partie antérieure de l'embryon croît en taille et le repli céphalique apparaît. L'endoderme définitif (en vert) remplace l'endoderme viscéral (en jaune) pour former une couche externe sur la face ventrale de l'embryon. La chorde (en rouge) commence à se former dans le tronc. Schéma central droit : vers E8,5, la croissance

de l'embryon s'est poursuivie en avant du nœud, la tête est distincte, les replis neuraux sont formés, le tube digestif s'est refermé dans ses parties antérieure et postérieure, et les somites commencent à se former de chaque côté de la chorde. L'embryon est recouvert d'une couche d'ectoderme qui formera l'épiderme et qui n'est pas présenté sur ce schéma. À droite : vers £10,5, la gastrulation et la neurulation sont achevées. L'embryon a subi un processus de courbure complexe vers E9 amenant les côtés dorsal et ventral à leurs positions définitives. Les barres d'échelles pour les trois premiers schémas = 100 µm ; pour le quatrième schéma, la barre d'échelle = 75 µm.

À mi-parcours du développement embryonnaire de souris, la gastrulation et la neurulation sont achevées, l'embryon a une tête bien distincte et les bourgeons des membres commencent à se développer. Un processus complexe de torsion a lieu vers E9 conduisant à un embryon de souris plus reconnaissable, entouré de ses membranes extra-embryonnaires (Fig. 3.26). Suite à cette torsion, l'épiblaste initial en forme de coupelle s'est retourné si bien que la face dorsale devient désormais externe, la face ventrale, avec le cordon ombilical qui le relie au placenta, est tournée vers l'intérieur. (la torsion est une autre exception du développement des rongeurs, les embryons humains sont entourés de leurs membranes extra-embryonnaires dès le début). L'organogenèse chez la souris se déroule de façon très comparable à celle de l'em-

bryon de poulet. La durée entre la fécondation et la naissance est de 18 à 21 jours, en fonction de la souche de souris.

3.6 Le développement précoce de l'embryon humain est similaire à celui de la souris

L'étude du développement des embryons des quatre vertébrés modèles choisis a fourni des principes généraux permettant de comprendre comment se développe l'embryon humain. Le cycle vital humain est présenté Fig. 3.27. 38 semaines séparent la naissance de la fécondation, ce qui est bien plus long que les durées vues chez les quatre vertébrés modèles. Dans les années 1970, la mise au point de méthodes permettant **Fig. 3.26 Retournement de l'embryon de souris.** Entre les stades E8,5 et E9,5, l'embryon de souris s'entoure intégralement de l'amnios protecteur et repose dans la cavité amniotique contenant le liquide amniotique. Le sac vitellin viscéral, source majeure pour la nutrition, entoure l'amnios et l'allantoïde connecte l'embryon au placenta. *Illustration d'après Kaufman, M.H. :* The Atlas of Mouse Development. *London : Academic Press, 1992.*





Fig. 3.27 Cycle vital d'un être humain. L'ovocyte est fécondé dans l'oviducte. Au moment où il atteint l'utérus, environ 5 jours après la fécondation, il s'est développé en un blastocyste qui s'extrait de la zone pellucide et s'implante dans la paroi utérine. Au cours de la semaine suivante, l'embryon proprement dit forme l'épiblaste, la couche épithéliale supérieure d'un disque didermique cellulaire avec au-dessus la cavité amniotique et en dessous le sac vitellin. Les autres changements qui ont lieu au même moment sont associés au développement du placenta et à la formation des membranes protectrices. La gastrulation a lieu au cours de la troisième semaine de développement, donnant naissance aux trois feuillets embryonnaires. Ceci est suivi par la courbure de l'embryon jusqu'alors dans un plan, en

un corps en trois dimensions. L'organogenèse a lieu entre les semaines 4 et 8 du développement. Au-delà, l'embryon est appelé fœtus et les 30 semaines suivantes sont dédiées principalement à la croissance et à la maturation des tissus et organes. Les photographies montrent : depuis le haut, un œuf fécondé juste avant la segmentation ; un embryon humain ; un bébé.

Photographie du haut aimablement communiquée par Alpesh Doshi. Photographie du milieu reproduite avec l'aimable autorisation de MRC/Wellcome funded Human Developmental Biology Resource. Photographie du bébé reproduite via la licence « creative commons attribution 2.0 generic license » ©Tarotastic.

la fécondation d'ovocytes humains *in vitro* et la culture des premiers stades de développement a constitué une avancée historique. Non seulement les premiers stades du développement humain pouvaient désormais être observés, mais aussi, cela a eu un impact majeur sur le traitement de la stérilité. Cela a permis également de nouveaux traitements cliniques comme, par exemple, le diagnostic pré-implantatoire (Encart 3A). Notre connaissance des stades plus tardifs du développement humain provient de descriptions de matériel cliniques collectés.

Les ovocytes humains non fécondés ont une taille semblable à ceux des souris. La fécondation a lieu normalement dans l'oviducte (aussi nommé, dans l'espèce humaine, trompe de Fallope ou tube utérin) et les premiers stades de développement ont lieu lorsque le zygote progresse vers l'utérus. Ces stades sont similaires à ceux de la souris, segmentation ou clivage, compaction et formation du blastocyste (Fig. 3.28). L'implantation se produit en général vers le 7^e jour de développement, alors qu'environ 256 cellules sont formées. Les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste humain peuvent être mises en culture comme cellules souches embryonnaires (Chapitre 8), et elles fournissent des modèles d'étude des processus du développement humain telle la différenciation cellulaire.



Fig. 3.28 Segmentation d'un embryon humain se développant in vitro. Les photographies montrent le clivage du zygote humain *in vitro* à partir du stade 2-cellules jusqu'à la formation du blastocyste. Les stades sont très comparables à ceux de l'embryon précoce de souris. Dans le schéma de droite, la flèche grise montre le trophectoderme, la flèche blanche désigne la masse cellulaire interne.

D'après Niakan, K.K., et al. : **Human pre-implantation embryo development.** Development 2012, **139** : 829-841.

Les processus d'implantation et de formation du placenta diffèrent de ceux décrits pour la souris, et cette dernière ne constitue pas un bon modèle pour ces aspects du développement humain. De plus, comme remarqué *supra*, la topologie de l'embryon humain juste avant la gastrulation est plus semblable à celle de l'embryon de poulet que de souris (Fig. 3.29). L'embryon proprement dit provient de l'épiblaste, couche épithéliale supérieure d'un disque didermique aplati, la couche inférieure étant l'hypoblaste. Une cavité, la cavité amniotique, s'étend au-dessus de l'épiblaste, la cavité du sac vitellin étant sous l'hypoblaste. La ligne primitive devient apparente sur la face supérieure de l'épiblaste à peu près au début de la troisième semaine de développement. Les cellules épiblastiques passeraient par la ligne primitive de la même façon que des cellules épiblastiques de l'embryon de poulet pour former le mésoderme et l'endoderme. Les cellules épiblastiques qui ne pénètrent pas forment l'ectoderme.

Au cours de la gastrulation, les axes principaux du corps deviennent apparents et la plaque neurale est induite et se replie pour former le tube neural. Alors que l'embryon plat continue de grandir et que ses organes commencent à se former, il subit un processus complexe de repliement, comme pour le poulet et la souris, suivi par la fermeture ventrale pour générer la forme tridimentionnelle du corps. L'expansion de l'embryon l'oblige aussi à adopter une forme convexe, avec les deux extrémités de l'axe principal qui s'enroulent et la cavité amniotique qui s'élargit de façon conséquente et venant entourer l'embryon alors que la cavité du sac vitellin se réduit fortement (Fig. 3.30).

Le liquide de la cavité amniotique peut être prélevé plus tard, entre la 14 et 16^e semaine de gestation, selon un procédé appelé amniocentèse. L'amniocentèse est utilisée pour des diagnostics prénataux. Les taux de certains produits métaboliques présents dans le liquide amniotique et issus du fœtus peuvent être mesurés et des cellules libérées par l'embryon dans le liquide peuvent être cultivées et analysées, par exemple, pour déceler des anomalies chromosomiques.

Les stades précoces du développement humain durent plus longtemps que les stades équivalents chez la souris. La formation du blastocyste, par exemple, n'a pas lieu avant 5 à 6 jours après la fécondation alors qu'elle a lieu 3 à 4 jours après fécondation chez la souris. De même la gastrulation se déroule au 14^e jour pour l'embryon humain alors qu'elle a lieu au 6^e jour chez la souris. La mise en place du plan d'organisation du corps et la formation des organes sont même plus lents et il faut 8 semaines pour que l'organisation du corps et des organes soit réalisée en miniature. Après 8 semaines, l'embryon humain est appelé fœtus et au cours du reste de la gestation, connue comme la période fœtale, ont lieu une croissance importante et la maturation complète des organes (Fig. 3.27).

Approches expérimentales pour étudier le développement des vertébrés

Cette partie de chapitre introduit quelques-unes des principales techniques utilisées pour étudier la biologie du développement des vertébrés. Non exhaustive, l'intention de cette partie est d'indiquer des approches expérimentales générales et de décrire





Fig. 3.29 Embryon humain au début de la gastrulation. La ligne primitive commence à se former à la surface supérieure de l'épiblaste, qui repose sur l'hypoblaste. La cavité située au-dessus de l'épiblaste est la cavité amniotique et la cavité sous l'hypoblaste est le sac vitellin. L'embryon est suspendu dans la cavité chorionique et est connecté à ses parois par une tige de mésoderme extra-embryonnaire (non présenté). La cavité chorionique est doublée par du mésoderme extra-embryonnaire qui donnera naissance à des vaisseaux sanguins reliés aux vaisseaux sanguins de l'embryon, établissant une circulation entre l'embryon et le placenta. La dépression à la surface de l'épiblaste marque la position de la future bouche.

ENCART 3A Diagnostic génétique pré-implantatoire

La fécondation *in vitro* (FIV) d'ovocytes humains est désormais considérée comme un traitement quasiment acquis contre la stérilité, alors que le premier bébé issu de FIV, Louise Brown, est né en 1978. Le scientifique britannique Robert Edwards et le clinicien Patrick Steptoe sont à l'origine du développement de la FIV. Edwards reçut le Prix Nobel en 2010, en l'absence de Steptoe, mort quelques années auparavant. La réussite du développement de la FIV a conduit à des traitements cliniques ultérieurs. Il est devenu possible de déterminer le génotype des embryons produits par FIV avant l'implantation sans nuire à l'embryon. Ce procédé nommé diagnostic génétique pré-implantatoire, s'est développé à la fin des années 1980 pour éviter à des couples fertiles de transmettre des maladies génétiques graves à leurs enfants. Le but était de fournir une alternative au diagnostic prénatal et à l'interruption potentielle d'une grossesse avec un embryon porteur de maladie.



Photographie reproduite avec la permission des Dr. Malpani, MD, Malpani Infertility Clinic, Mumbai, India. iite www.drmalpani.com.

Figure 1

Pour le **diagnostic pré-implantatoire**, un blastomère est retiré d'un embryon produit par FIV lors de la segmentation précoce *in vitro* sans que cela n'affecte la suite de son développement (Figure 1). L'ADN de ce blastomère est amplifié *in vitro* et la

présence ou l'absence de mutations connues comme associées à des maladies est évaluée. Quand les parents présentent un haut risque de transmission d'une maladie génétique particulière, par exemple quand ils sont tous deux porteurs d'un allèle responsable de la mucoviscidose, le diagnostic génétique pré-implantatoire peut être utilisé pour s'assurer qu'un embryon qui développerait cette maladie ne soit pas implanté chez la mère (Figure 2).

La demande de diagnostic génétique pré-implantatoire augmentera sans doute car il permet de déceler des embryons porteurs de mutations qui causeront inévitablement une maladie potentiellement mortelle au cours de l'enfance et de l'adolescence, mais aussi d'identifier des embryons porteurs de mutations prédisposant les individus concernés à une maladie tardive. Un exemple est celui du gène *BRCA1*, dont certaines mutations prédisposent les femmes porteuses à développer des cancers du sein ou de l'ovaire, et 80 % de ces tumeurs chez les femmes résultent d'une prédisposition héritée génétiquement (ils représentent 5 à 10 % de l'ensemble des cancers du sein ou de l'ovaire). Chez les hommes, les mutations de *BRCA1* sont liées à une prédisposition plus élevée au cancer de la prostate. En déterminant si un embryon issu d'une famille à haut risque est porteur d'un allèle muté du gène *BRCA1*, la prédisposition génétique de ces cancers devrait, en principe, disparaître de la famille. Au moins un bébé est né d'un couple à haut risque après

une FIV et la sélection par diagnostic pré-implantatoire d'un embryon dépourvu d'un allèle malade sur le gène *BRCA1*. En Grande-Bretagne, le diagnostic génétique préimplantatoire a été autorisé par le Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) pour plus de 60 maladies génétiques.

Le diagnostic pré-implantatoire pose des questions d'ordre pratique et éthique, à savoir pour quelles maladies génétiques il doit être appliqué. En Grande-Bretagne, le HFEA a établi une règle générale permettant de prendre des décisions au cas par cas pour des pathologies qui ne figureraient pas sur sa liste. Un exemple du type de question éthique posé est illustré par le cas de parents désirant sélectionner un





embryon issu de FIV porteur de la meilleure compatibilité HLA avec un frère ou une sœur souffrant d'une maladie sanguine rare, ce qui permettrait ainsi au bébé issu de FIV de donner des cellules souches à son frère ou sa sœur. Des cas comparables ont été approuvés pour des diagnostics pré-implantatoires en Grande-Bretagne.



en détail quelques techniques très couramment utilisées. Plutôt que d'effectuer une lecture d'un trait, il peut être envisagé d'utiliser cette partie en tant que référence pour remettre dans leur contexte certaines des expériences décrites dans le reste de cet ouvrage. Un grand nombre des techniques décrites ici sont également applicables à des non-vertébrés (Chapitres 2 et 6).

Les premières études du développement embryonnaire des vertébrés ont impliqué une étude attentive et détaillée d'embryons entiers disséqués sous le microscope, et l'observation, la description et le dessin du développement d'embryons à accès facile comme les tritons ou les grenouilles. À partir du XVII^e siècle, les observations d'embryons d'animaux et humains par des zoologistes et des médecins a peu à peu conduit aux descriptions anatomiques complètes du développement embryonnaire qui sont à la base de la biologie du développement moderne. Le nœud de Hensen et le croissant de Koller (Section 3.4), par exemple, portent les noms de deux embryologistes de la fin du XIX^e siècle et du début du XX^e siècle. L'observation minutieuse est tout aussi importante dans la biologie du développement actuelle, même si la nécessité de dessiner à la main les observations microscopiques a été remplacée par la technologie d'imagerie numérique. Une autre technique importante pour étudier le développement normal est la conception de cartes des territoires présomptifs, présentant ce qu'une région précise de l'embryon donnera par la suite. Les cartes des territoires présomptifs des quatre vertébrés modèles seront discutées Chapitres 4 et 5.

Des descriptions anatomiques et cellulaires du développement normal sont désormais remplacées par la cartographie de profils d'expression de gènes importants du développement. Cette avancée est issue d'une méthode du milieu du XX^e siècle permettant de détecter l'expression de gènes dans des cellules et des tissus par la technique d'**hybridation d'acide nucléique** *in situ*, impliquant l'utilisation d'ARN marqués (ribosondes) complémentaires de l'ARN d'intérêt pour détecter les transcrits des gènes (Encart 1D). Les protéines produites à partir des transcrits peuvent être détectées par des anticorps spécifiques marqués par fluorescence (Encart 1D), et ces techniques peuvent aussi être appliquées à des coupes de tissus ou des organismes entiers (Fig. 12.1). Des projets à large échelle sont actuellement en cours pour produire un « atlas » exhaustif en ligne des profils d'expression normale de centaines de gènes à différents stades du développement pour la souris et le poulet (voir Références bibliographiques).

Des techniques telles que l'analyse par puces à ADN et le séquençage d'ARN, ARNseq, peuvent aussi détecter et identifier l'expression d'un grand nombre de gènes au même moment et ainsi fournir des informations sur tous les gènes pouvant s'exprimer dans un tissu particulier ou à un stade donné du développement (Encart 3B).

Cependant, l'observation seule ne permet pas de révéler les mécanismes sous-tendant des processus du développement, et la seule façon d'en savoir plus sur ceux-ci est de perturber le processus du développement d'une manière spécifique et d'en Fig. 3.30 Le processus de repliement de l'embryon humain et l'expansion de la cavité amniotique. Entre les jours 21 et 28 du développement, l'embryon d'abord plan prend sa forme tridimentionnelle. Le repliement latéral conduit à la fusion ventrale des bords, tandis que l'expansion de l'embryon provoque l'enroulement des deux extrémités de l'axe principal du corps (flèches bleues, schéma central). Cette flexion de l'axe principal du corps s'accompagne d'une expansion de la cavité amniotique, qui vient entourer l'embryon alors que le sac vitellin se réduit (schéma de droite).

ENCART 3B Profils d'expression génique par puces à ADN et séquençage d'ARN

Seuls seront envisagés dans cet ouvrage les principes généraux sous-jacents au développement et non chaque gène connu à ce jour comme étant impliqué dans la mise en place du plan d'organisation des animaux traités. Cependant, les génomes des vertébrés modèles étant désormais séquencés, des approches pangénomiques systématiques sont utilisées pour identifier tous les gènes impliqués dans un processus particulier du développement. L'utilisation des informations des séquences génomiques permet aussi d'identifier les cibles de facteurs de transcription coordonnant l'expression des gènes dans l'espace et le temps.

L'identification de tous les gènes exprimés dans un tissu donné ou à un moment précis du développement peut être réalisée par la mise en œuvre de détection pangénomique de l'expression de gènes par puces à ADN,

aussi appelées biopuces. Cette technologie permet la mesure simultanée des taux d'ARN transcrits de centaines de gènes, et le principal usage des puces en biologie du développement est pour suivre les changements d'expression de gènes survenant au sein d'un tissu ou d'un embryon à différents stades du développement ou après une manipulation expérimentale. Des formats variés de puces existent pour étudier l'expression génique, mais les plus couramment utlisées sont des surfaces planes sur lesquelles sont fixés en rangées régulières des dépôts de fragments d'ADN de séquences connues, chacun représentant une séquence présente dans un gène spécifique codant une protéine. Ces fragments d'ADN sont nommés « sondes » et une puce à ADN peut contenir des centaines voire des milliers de sondes différentes. Des puces constituées de centaines de milliers de sondes oligonucléotidiques synthétisées spécialement pour couvrir l'ensemble des séquences du génome des quatre vertébrés modèles considérés dans cet ouvrage sont désormais commercialisées.

Pour déterminer quels sont les gènes exprimés dans un tissu d'intérêt, les ARNm totaux en sont extraits, puis soit amplifiés en tant qu'ARN, soit convertis en ADNc et amplifiés par réaction en chaîne par polymérase (PCR). L'acide nucléique est marqué avec un composé fluorescent et hybridé sur la puce à ADN. Un échantillon d'ARNm de référence traité à l'identique mais marqué avec un composé fluorescent distinct est aussi hybridé sur la même puce. Celle-ci est alors scannée et les ratios des signaux des deux marqueurs fluorescents de chaque dépôt sont enregistrés et convertis en niveau d'expression relatif par rapport à l'échantillon test.



Figure 1

Des expériences fondatrices menées au début des années 2000 ont utilisé des puces pour identifier tous les gènes exprimés à différents stades du développement précoce de la souris. Les gènes exprimés dans les ovules, les zygotes, les stades 2-cellules, 4-cellules, 8-cellules, le stade morula et le stade blastocyste ont été identifiés en extrayant les ARNm de 500 œufs ou embryons aux stades appropriés, en les marquant et en les hybridant à des puces miniatures d'oligonucléotides uniques de 60 bases chacun, représentant tous les gènes de la souris (Figure 1). Les motifs de liaison des ARN marqués indiquent quels sont les gènes exprimés aux différentes étapes. Des analyses similaires d'expression pangénomique, utilisant des puces, ont été menées aux mêmes stades de développement sur des embryons précoces humains.

Une autre technique de plus en plus utilisée pour déterminer quels sont les gènes exprimés dans des tissus donnés ou à un moment précis du développement implique un séquençage direct et est nommée séquençage d'ARN (**RNA seq**). Cette approche est rendue possible par le développement du séquençage d'ADN de nouvelle génération. Les ARNm sont extraits des cellules, fragmentés, convertis en ADN et amplifiés. Les ADNc sont marqués et séquencés directement pour générer un grand nombre de séquences de haute résolution qui sont ensuite cartographiées sur un génome de référence. Le niveau d'expression d'un gène donné est mesuré par la densité des séquences correspondant à ce gène. L'avantage de l'ARNseq est qu'il est plus précis que les puces et qu'il peut fournir des informations supplémentaires, concernant, par exemple, l'épissage alternatif des transcrits.

étudier. le résultat. Les techniques pour interférer sur le développement sont globalement de deux types et de nombreuses expériences de biologie du développement utilisent une combinaison de ces deux approches. Les techniques expérimentales classiques manipulent l'embryon par des interventions physiques, en enlevant ou ajoutant des cellules à des embryons en cours de segmentation, ou en greffant des blocs





de cellules d'un embryon à un autre, par exemple. Le second type de techniques basé sur la génétique, est utilisé pour perturber l'expression de gènes du développement importants par mutation, extinction, surexpression ou mauvaise expression c'est-àdire expression du gène à un moment ou à un endroit où il n'est normalement pas exprimé.

Les techniques de cartographie des territoires présomptifs chez le xénope seront brièvement vues avant d'envisager la manipulation expérimentale des embryons de xénope et de poulet et quelques techniques de biologie moléculaire, génétique et génomique qui ont révolutionné l'étude de la biologie du développement au cours des 30 dernières années. D'autres avancées techniques qui ont profité à la biologie du développement ces 20 dernières années proviennent de progrès formidables dans les techniques d'imagerie microscopique assistées par ordinateur, le développement de marqueurs fluorescents avec une large gamme de couleurs rendant possible l'imagerie *in vivo* d'embryons, et l'introduction de nouvelles formes d'imagerie telles l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la micro-tomographie à projection optique (OPT). L'IRM permet désormais d'obtenir des images *in vivo* d'embryons à l'intérieur des œufs (Fig. 3.31).

3.7 La cartographie de la destinée des cellules et le traçage du lignage révèlent quelles cellules de l'embryon précoce donnent naissance aux structures adultes

Pour des raisons à la fois biologiques et techniques, la cartographie de la destinée des cellules d'un embryon précoce est plus facile chez le xénope. Même au stade blastula, les cellules qui formeront les trois feuillets embryonnaires sont disposées dans des régions distinctes et sont accessibles depuis la surface de l'embryon (Fig. 3.6). Des blastomères isolés peuvent être facilement marqués par injection d'un marqueur non toxique comme la dextran-amine fluorescéine ou par la production d'une protéine fluorescente telle la protéine verte fluorescente (GFP) à partir d'ARN injecté. La dextran-amine fluorescéine est une molécule stable de haut poids moléculaire ne pouvant pas traverser les membranes cellulaires, étant ainsi restreinte aux cellules injectées et à leur descendance. La fluorescéine excitée par la lumière UV émettant une fluorescence verte, le dextran marqué à la fluorescéine peut être facilement détecté avec un microscope à fluorescence. Des formes stables de GFP sont maintenant largement utilisées car sa fluorescence intense peut être décelée in vivo dans des embryons et permet de tracer un lignage à long terme. La figure 3.32 présente une carte des territoires présomptifs pour un embryon de xénope obtenue après injection de dextran-amine fluorescéine dans une cellule au stade 32-cellules.

En suivant la destinée de cellules individuelles ou de groupes de cellules dans des embryons de xénope, une carte peut être établie sur la surface d'une blastula montrant le devenir des différentes régions, par exemple, chorde, somites, système nerveux ou Fig. 3.31 Un embryon vivant de caille de neuf jours dans son œuf. L'image à gauche a été obtenue en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Photographie aimablement communiquée par Suzanne Duce.

Fig. 3.32 Carte des territoires présomptifs

de l'embryon de xénope. À gauche : une cellule unique dans l'embryon C3 est marquée par l'injection de la dextran-amine fluorescéine, qui fluoresce dans le vert sous une excitation UV. À droite : coupe transversale d'un embryon au stade têtard montrant que la cellule marquée a donné naissance à des cellules mésodermiques sur un des côtés de l'embryon. Barre d'échelle = 0,5 mm.

Photographie aimablement communiquée par L. Dale.



Fig. 3.33 Photographies de tissu chimérique caille-poulet. Les cellules de caille sont sur la gauche et les cellules de poulet sont sur la droite. Noter la coloration intense des noyaux de cellules de caille.

Photographie aimablement communiquée par N. Le Douarin.



tube digectif. La carte des territoires présomptifs montre l'origine des trois feuillets embryonnaires dans le développement normal mais elle ne rend pas compte du potentiel entier offert par chaque région ni dans quelle mesure le devenir de chaque région est déjà spécifié ou déterminé dans la blastula. Les embryons de vertébrés ont des capacités considérables de régulation quand des morceaux sont ôtés ou greffés en un site différent du même embryon (Section 1.12). Cela implique l'existence et la persistance d'une plasticité du développement considérable (Chapitres 4 et 5), ainsi qu'une grande dépendance du sort des cellules aux signaux qu'elles reçoivent en provenance des cellules voisines.

Les cartes de territoires présomptifs ont été établies chez l'embryon de poulet en colorant de petits groupes de cellules avec un composé lipophile tel le Dil, et en repérant la localisation finale les cellules marquées. L'injection de molécules comme la dextran-amine fluorescéine dans des cellules individuelles est plus difficile, les cellules des embryons de poulet étant beaucoup plus petites. Mais, cette technique a, par exemple, été utilisée avec succès pour tracer le lignage des cellules dérivées du nœud de Hensen.

Les chimères caille-poulet ont aussi été utilisées pour tracer le lignage cellulaire. Une chimère est un organisme constitué de cellules avec un matériel génétique différent, et un embryon chimérique caille-poulet peut être obtenu en greffant du tissu ou des cellules issus d'un embryon de caille dans un embryon de poulet. L'utilisation des chimères sera revue dans ce chapitre pour l'obtention de souris transgéniques et avec l'étude du développement précoce de la souris (Chapitre 5). Les embryons de poulet et de caille ont un développement très similaire et les embryons constitués d'un mélange de cellules de poulet et de caille se développeront normalement. Les cellules des deux espèces peuvent être distinguées par l'aspect différent de leurs noyaux, les cellules de caille ayant un nucléole proéminent coloré en rouge avec une coloration appropriée (Fig. 3.33). Les cellules de caille peuvent aussi être distinguées de celles du poulet par marquage immunohistochimique grâce à des anticorps marqués, spécifiques des protéines de caille. Pour le traçage des lignages, les cellules sont prises d'un site donné dans un embryon précoce de caille et greffées au même site chez un embryon de poulet de même âge. Des coupes d'embryons de stades plus tardifs sont colorées afin de déterminer la localisation des cellules de caille. L'accès récent à des embryons transgéniques de poulet exprimant la GFP dans toutes leurs cellules (Section 3.10) permet la cartographie à long terme de leurs cellules une fois greffées. L'utilisation de greffes de tissus d'axolotls transgéniques exprimant la GFP sera vue lors de l'étude de la régénération des membres (Chapitre 13).

De petites populations de cellules définies, voire des cellules isolées, peuvent aussi être aisément marquées chez des embryons de poulet, dans l'œuf (*in ovo*) ou en culture, en introduisant une séquence d'ADN codant une protéine fluorescente. Ces séquences peuvent cibler un nombre relativement petit de cellules par la technique d'électroporation. L'ADN est injecté dans l'embryon au site souhaité avec une pipette fine et des impulsions électriques sont appliquées grâce à des électrodes très fines. Le courant perméabilise les membranes des cellules à l'ADN injecté.

Le traçage des lignages cellulaires et la cartographie des territoires présomptifs par injection de colorants ou électroporation d'acides nucléiques sont techniquement plus complexes chez les embryons de mammifères que chez le xénope ou le poulet car les embryons, au sein de l'organisme maternel, sont moins accessibles. Néanmoins, ces techniques ont été utilisées pour suivre le devenir des cellules d'embryon de souris entre E6,5 et E8,5, stades que l'on peut maintenir en culture (Section 3.8). Des chercheurs ont ingénieusement contourné le problème, même si certaines de ces techniques requièrent une grande habileté. Par exemple, pour étudier la migration des neurones dans le cerveau en développement, une séquence d'ADN codant pour la GFP est injectée dans les ventricules latéraux du cerveau d'embryons de souris in utero (vers E14), avec une électroporation, sans nuire aux embryons. Les coupes du cerveau de ces embryons à des stades ultérieurs et de nouveau-nés sont examinées par microscopie à fluorescence afin de localiser les neurones marqués par la GFP qui sont donc issus de la couche cellulaire juste sous la surface des ventricules (Chapitre 12). Tracer le lignage chez la souris est maintenant plus aisé en utilisant des embryons transgéniques (Section 3.10).

3.8 Toutes les techniques ne s'appliquent pas à l'ensemble des vertébrés

Les expériences impliquant des manipulations de microchirurgie d'embryons de vertébrés concernent surtout le xénope et le poulet. Quelques mutations spontanées affectant le développement sont connues chez ces animaux, et les embryons de poulet et d'amphibiens étaient déjà étudiés bien avant que les gènes du développement ne soient identifiés. *Xenopus laevis* n'est pas approprié pour des analyses génétiques du fait de son temps de génération long (un an environ) et de son génome tétraploïde. Les embryons d'amphibiens et d'oiseaux sont cependant robustes et facilement manipulables chirurgicalement à tous les stades de leur développement, contrairement à ceux des mammifères (Fig. 3.34). Des manipulations de microchirurgie chez les amphibiens, telles l'ablation de certains blastomères ou la greffe de cellules d'un

Fig. 3.34 La pertinence des différents modèles de vertébrés pour l'étude expérimentale embryonnaire classique.

Adéquation des différents embryons de vertébrés aux manipulations classiques d'embryologie expérimentale						
	Crapaud (<i>Xenopus laevis</i>)	Poisson-zèbre	Poulet	Souris		
Des embryons vivants sont-ils facilement disponibles et observables à tous les stades de leur développement ?	Oui. Des ovules peuvent être obtenus, fécondés de façon externe et les embryons se développent jusqu'au stade têtard dans un aquarium. De grandes quantités d'oules peuvent être fécondése en même temps et se développer de façon synchrone, permettant l'obtention de nombreux embryons à un même stade du développement.	Oui. Comme pour le <i>xénope</i> .	Pour la plupart d'entre eux. Les ovules subissent une fécondation interne et les stades de développement très précoces, jusqu'au stade blastoderme, se déroulent au sein de la poule. Les œufs, facilement disponibles après la ponte, peuvent être incubés en laboratoire et le développement de l'embryon est observable à n'importe quel moment jusqu'à l'éclosion. Des embryons précoces peuvent aussi être cultivés hors de l'œuf jusqu'au stade 10.	Seulement les stades les plus précoces. Les ovules fécondés <i>in vitro</i> peuvent être cultivés jusqu'au stade blastocyste, après quoi ils doivent être replacés dans une souris porteuse pour poursuivre leur développement. Les embryons isolés précocement ne peuvent être mis en culture que pour un temps limité (voir Section 3.8).		
L'embryon se prête-t-il à des manipulations expérimentales, comme la suppression ou l'ajout de blastomères, ou des greffes de tissus ?	L'embryon peut être manipulé chirurgicalement jusqu'au stade neurula (voir Chapitre 4). Les embryons sont relativement grands et hautement résistants aux infections après la microchirurgie.	L'embryon se prête à des manipulations chirurgicales jusqu'au stade neurula et dans une certaine mesure jusqu'à des stades ultérieurs. L'embryon est transparent, ce qui aide à suivre les changements liés au développement et le mouvement de cellules marquées.	L'embryon peut être manipulé jusqu'à des stades relativement avancés du développement embryonnaire, le stade de développement des membres compris (voir Chapitres 5, 11 et 12).	Seuls les embryons très précoces, jusqu'au stade blastocyste, peuvent être manipulés s'ils sont replacés ensuite dans des souris porteuses pour poursuivre leur développement (voir Fig. 3.39). Des embryons isolés après implantation peuvent être cultivés sur un temps limité (voir Section 3.8).		
Les cartes de territoires présomptifs et les lignages cellulaires sont-ils relativement faciles à établir ?	Oui, dans l'embryon précoce. Des cellules isolées de la blastula précoce peuvent être injectées avec un marqueur vital fluorescent ou un ARN codant une protéine fluorescente (GFP)(voir Fig. 3.32).	Oui, comme pour le xénope	Relativement facile et les cellules peuvent être marquées à des stades embryonnaires relativement tardifs par l'injection de marqueurs colorés ; l'utilisation d'embryons chimères caille-poulet ; des greffes de poulet GFP (voir ci-dessous) ou l'électroporation d'ADN codant une protéine reporteur ou une protéine fluorescente (voir Section 3.7).	Difficile par le passé. Maintenant, cela devient plus facile grâce aux techniques transgéniques permettant de restreindre l'expression de gènes rapporteurs à des cellules particulières (voir Section 3.10 et Encart 30) et aussi grâce aux transgènes inductibles.		



Fig. 3.35 Un embryon de poulet peut être observé grâce à une fenêtre découpée dans la coquille. L'embryon quasi-transparent de 3,5 jours (stade 21 de H&H) est visible, posé sur le vitellus. Après une manipulation, la fenêtre peut être refermée avec du ruban adhésif permettant à l'embryon de poursuivre son développement.

embryon à un autre, ont fourni la plupart des informations sur la localisation et la fonction des régions organisatrices de la blastula et leurs rôles dans le développement. Plusieurs expériences de ce type sont illustrées chez le xénope Chapitre 4. L'ablation de blastomères permet d'identifier des régions embryonnaires essentielles au développement futur alors que les expériences de greffe sont utilisées pour tester le potentiel de développement d'une région donnée de l'embryon ou déterminer le moment à partir duquel la destinée des cellules devient déterminée irréversiblement (Section 1.12). Les cellules d'embryons précoces d'amphibiens possèdent leurs propres réserves nutritives sous la forme de plaquettes vitellines, et des explants de tissus embryonnaires peuvent être cultivés dans un milieu salin simple pendant quelques jours. Ceci autorise des expériences qui examinent les effets d'induction d'un tissu sur un autre quand ils sont placés ensemble en culture. Des expériences de ce type chez le xénope sont décrites dans le chapitre 4. Des explants similaires ont été menés avec des tissus embryonnaires de poulet contenus dans des gels de collagène et en utilisant des milieux de culture cellulaire.

L'embryon de poulet précoce (stade blastoderme) peut être sorti de l'œuf et cultivé sur sa membrane vitelline avec un peu d'albumen dans un verre de montre. Il poursuivra son développement sur environ 36 heures (stade 10 de Hamilton et Hamburger). Des expériences chez le poulet, dans lesquelles des morceaux d'embryons sont greffés sur un autre embryon en culture à différents stades, ont aussi fourni des informations sur les propriétés organisatrices de régions variées de l'embryon et sur la genèse de la ligne primitive (discuté Chapitre 5). Des embryons plus âgés sont accessibles par l'ouverture d'une fenêtre dans la coquille d'œuf et manipulables tout en restant dans l'œuf (Fig. 3.35). La fenêtre est alors rescellée avec du ruban adhésif et l'embryon peut poursuivre son développement de telle sorte que les effets de ces procédures peuvent être évalués. L'accessibilité de l'embryon de poulet permet plusieurs types de procédures expérimentales : une partie d'une structure en développement, tel un bourgeon de membre, peut être enlevée ; des tissus peuvent être greffés en d'autres sites ; et les effets sur le développement de facteurs chimiques tels les facteurs de croissance peuvent être étudiés en implantant de petites billes inertes recouvertes de ces agents dans une région précise de l'embryon. Des exemples de ce type d'expériences pour étudier le membre de poulet sont décrits Chapitre 11.

Après implantation, le développement de la souris *in vivo* n'est plus visible, et ne peut être suivi qu'en isolant les embryons à différents stades. Les tissus d'embryons très précoces peuvent être cultivés sur un temps limité. Par exemple, les masses cellulaires internes isolées d'embryons de 3,5 jours et cultivées *in vitro* sur plusieurs jours formeront certains tissus embryonnaires et extra-embryonnaires et des structures typiques de l'embryon normal au même stade. Des embryons de souris entre E6,5 et E12,5 ont été cultivés sur 24-48 heures dans des tubes en rotation permettant des manipulations comme des greffes du nœud. L'étude expérimentale de tissus d'embryons vivants à des stades ultérieurs requiert la dissection des embryons et la croissance d'explants de tissus ou d'organes, comme les bourgeons de membre, les reins ou les poumons embryonnaires, *in vitro*.

3.9 Des gènes du développement peuvent être identifiés grâce à des mutations spontanées et des criblages de mutagenèse à large échelle

Pour identifier les gènes du développement, une méthode génétique directe repère d'abord un organisme mutant par son phénotype anormal avant que soient menées des expériences de génétique pour trouver le gène impliqué. Les rares mutations spontanées ont été pendant longtemps la seule possibilité d'étudier les perturbations génétiques du développement, et elles ont constitué le point de départ de la génétique classique. De telles mutations spontanées ont été identifiées chez la souris (Fig. 1.12) et le poulet. Cependant, les mutations spontanées informatives sont rares, même chez la souris, et ne sont décelées que si l'animal survit jusqu'à la naissance. Les mutations de gènes de développement importants conduisant à la mort de l'embryon *in utero* (**mutations létales embryonnaires**), sont probablement passées inaperçues. Ainsi une seule mutation létale embryonnaire a été découverte chez le poulet, car elle réduisait la possibilité d'éclosion des œufs.

Les mutations géniques spontanées ou héritées conduisent à des anomalies congénitales chez des sujets humains, et la génétique clinique a ouvert une voie pour la découverte de gènes importants du développement. La population humaine étant très grande, des événements exceptionnellement rares peuvent être détectés, et parce que les anomalies chez des patients sont examinées en détail, des mutations induisant des phénotypes assez discrets ont été identifiées. De cette façon, les études humaines ont permis de faire correspondre des mutations génétiques spécifiques avec des phénotypes bien précis. Dans certains cas, des mutations substituant par un autre un seul acide aminé d'une protéine, peuvent avoir des effets tout à fait différents en fonction de l'identité des acides aminés substitués et substituant. La compréhension des mécanismes du développement sous-jacents repose cependant sur des expériences menées sur les vertébrés modèles.

Beaucoup plus de gènes du développement ont été identifiés en induisant des mutations aléatoires par des traitements chimiques ou l'irradiation aux rayons X chez un grand nombre d'organismes expérimentaux, et la recherche de mutants présentant des phénotypes inhabituels d'intérêt pour le développement. Ceux-ci peuvent être analysés par des techniques de génétique classique et moléculaire pour découvrir le gène responsable du phénotype mutant. L'objectif, si possible, est de traiter une population assez grande pour induire au final une mutation dans chaque gène du génome. Ce type d'approche est plutôt utilisé sur des organismes à reproduction rapide pouvant facilement être obtenus et traités en grands nombres. Parmi les vertébrés, cette approche a été appliquée à la fois à la souris et au poisson-zèbre. Celui-ci constitue, en particulier, un vertébré de choix pour la mutagenèse à grande échelle car un grand nombre d'individus peuvent être manipulés, et la translucidité et la grande taille des embryons facilitent l'identification des anomalies du développement. Mais contrairement au criblage génétique chez la drosophile (Encart 2A), pour le poisson-zèbre il n'existe encore aucun moyen génétique pour éliminer automatiquement les individus non affectés. Cela signifie que toute la descendance d'un croisement doit être examinée de visu pour la moindre anomalie du développement.

La mutagenèse chimique génère à la fois des mutations dominantes avec des degrés variables d'atteinte de la fonction du gène et particulièrement pertinentes pour les maladies humaines, et des mutations récessives perte de fonction. Les mutations dominantes peuvent être identifiées chez les descendants de la génération F_1 , par exemple, chez la souris (Fig. 3.36), mais des programmes d'élevage plus élaborés tels ceux décrits pour le poisson-zèbre (Encart 3C) ont permis de révéler des mutations récessives. Le criblage de mutations récessives a aussi été mené chez la souris mais à



Fig. 3.36 Criblage par mutagenèse des mutations dominantes chez la souris. La souris mâle est traitée avec l'agent mutagène N-nitroso-N-éthylurée (ENU). Après l'accouplement avec une femelle non traitée, la descendance porteuse d'une mutation dominante, telle celle du pelage marron foncé présentée ici peut être détectée dans la première génération (G,).

ENCART 3C Criblages de mutagenèse à large échelle pour des mutations récessives chez le poisson-zèbre

Un programme de criblage pour des mutations récessives chez le poisson-zèbre implique d'élever trois générations (Figure 1). Les poissons mâles traités avec un agent mutagène sont croisés avec des femelles de type sauvage (+/+) pour former les individus de génération F₁ qui sont tous censés être hétérozygotes pour une mutation ponctuelle (m*) dans un gène différent. Chaque mâle de F_1 est croisé à son tour avec une femelle de type sauvage pour générer des générations de poisson F₂ différentes. Si le poisson F_1 parent porte une mutation (m1), 50 % des poissons de génération F₂ m1 seront hétérozygotes (m1/+) pour cette mutation de sorte que quand les frères et sœurs de cette génération F₂ sont eux-mêmes croisés, 25 % de ces croisements seront entre deux hétérozygotes et 25 % de leur descendance (génération F_a, représentée ici par les zygotes) sera homozygote pour la mutation. L'étape finale est d'identifier la mutation génétique qui a conduit au phénotype mutant. Le développement de poissons-zèbres haploïdes peut aussi être initié en fécondant des ovules avec un sperme fortement irradié aux UV. Cela permet de détecter des mutations récessives agissant dans le développement précoce sans avoir



Figure 1

besoin d'accoupler les poissons pour obtenir des embryons homozygotes.

La descendance des poissons mâles traités par un agent mutagène chimique, qui aura des mutations sur différents gènes, peut être criblée pour identifier un individu avec des mutations sur un gène spécifique par une approche nommée, « identification des lésions induites localement » ou TILLING (pour *Targeting-Induced Local Lesions In Genomes*). Cette technique initialement conçue chez les plantes a depuis été utilisée chez la drosophile, *C. elegans*, le rat et le poisson-zèbre, il suffit de connaître la séquence ADN du gène. Les poissons mâles traités avec l'agent mutagène ENU (N-nitroso-N-éthylurée) sont croisés avec des femelles de type sauvage. Un échantillon de tissu de chaque individu mâle de F_1 , porteur d'une mutation ponctuelle sur un gène différent, est alors prélevé et, en même temps, son sperme est congelé et stocké. Pour identifier les individus porteurs d'une mutation sur le gène d'intérêt, de grandes quantités d'ADN sont générées à partir de la région pertinente du génome d'échantillons de tissus provenant de tous les individus mâles de F_1 par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Cet ADN est alors hybridé avec la séquence non mutée du gène en question. Les bases non appariées révéleront le site d'une mutation. L'ADN est alors séquencé pour identifier l'altération précise. L'individu mâle porteur de la mutation recherchée, et/ou son sperme congelé, est utilisé pour générer des familles de poissons mutants, qui révéleront les changements phénotypiques associés au gène muté.

cause du petit nombre de petits par portée et de la difficulté à observer les embryons, il est plus coûteux et difficile à pratiquer. De nombreux criblages semblables ont néanmoins été réalisés.

3.10 Les techniques transgéniques permettent la production d'animaux porteurs de mutations dans des gènes spécifiques

La génétique inverse, l'autre grande approche pour découvrir des gènes ayant des fonctions importantes dans le développement, part des gènes et analyse le phénotype généré quand le gène donné est altéré. Dans la technique du TILLING utilisée, par exemple pour le poisson-zèbre (Encart 3C), la mutagenèse aléatoire est employée pour générer des générations d'individus mutants. Les poissons porteurs de la mutation recherchée sont d'abord identifiés par analyse de leur ADN, puis leur phénotype est analysé pour caractériser tout changement. Cependant, il est encore plus efficace d'altérer le gène d'intérêt directement chez l'animal, plutôt que de se fier à la mutagenèse aléatoire. Ceci peut être obtenu par une grande variété de techniques qui, soit suppriment le gène cible, soit le remplacent par une autre version porteuse de mutations. Les animaux chez lesquels a été introduit un gène ajouté ou altéré sont nommés animaux transgéniques, et des souches de souris transgéniques, avec une constitution génétique mutante particulière, sont maintenant produites en routine. Tant que la mutation est récessive, les animaux hétérozygotes pour cette mutation peuvent être conservés comme reproducteurs, même pour des mutations qui se révéleraient létales pour l'embryon à l'état homozygote.

Des poissons-zèbres transgéniques peuvent être obtenus en injectant de l'ADN dans l'embryon au stade une-cellule, et le premier transgène à avoir été inséré avec succès dans un poisson-zèbre a été le gène *cristalline delta* du poulet. La transgenèse a été réalisée chez le poulet, en injectant des vecteurs lentiviraux contenant un gène codant la GFP sous le blastoderme d'un œuf juste pondu (Fig. 3.37). Et même si *X. laevis* se prête moins à la transgenèse de la lignée germinale, les techniques de transgenèse qui ont été développées pour son proche parent *X. tropicalis*, qui est diploïde et qui présente un temps de génération plus court de 5 à 9 mois, peuvent aussi être utilisées. Pour le xénope, la stratégie est d'introduire le transgène dans le noyau des spermatozoïdes puis de transplanter ces noyaux dans des œufs vierges. L'adéquation relative des quatre vertébrés modèles pour ces techniques génétiques est résumée Fig. 3.38.

Les techniques transgéniques sont très bien développées chez la souris. Deux techniques principales de production de souris transgéniques sont actuellement utilisées. L'une consiste à injecter directement dans le pronucleus mâle d'un œuf fécondé, un **transgène**, séquence d'ADN du gène d'intérêt avec ses régions régulatrices indispensables, puis de placer l'œuf dans une mère de substitution. Si le transgène s'intègre dans le génome, il sera présent dans toutes les cellules de l'embryon, même dans la lignée germinale, et il s'exprimera sous le contrôle du promoteur et des autres régions régulatrices qu'il contient. Ainsi, peuvent être produites des souris surexprimant un gène donné dans des cellules particulières ou à un moment précis du développement, et les effets de l'expression altérée d'un gène dans un tissu ou à un moment où il est habituellement inactif pourront être étudiés.

L'autre technique de production de souris transgéniques utilise des cellules souches embryonnaires (cellules ES) ayant été mutées *in vitro*. Cette technique de transgenèse est la plus couramment utilisée pour induire l'invalidation permanente de la fonction d'un gène spécifique ou *knock-out*. Les cellules ES sont des cellules pluripotentes



Fig. 3.37 Poussins transgéniques exprimant la protéine fluorescente verte

(GFP). Des poussins transgéniques peuvent être obtenus en injectant de l'ADN inséré dans un vecteur lentiviral auto-inactivant dans la cavité blastocœlienne située sous le blastodisque des œufs juste pondus. Les poussins présentés sont des descendants de deuxième génération obtenus à partir d'un poulet transgénique originel qui exprimait la GFP dans sa lignée germinale. Le poussin au centre n'est pas transgénique.

Photographie de McGrew, et al. : *Efficient* production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. EMBO Rep 2004, 5 : 728-733.

Adéquation des différents modèles de vertébrés aux techniques basées sur la génétique pour l'étude du développement						
	Crapaud (<i>Xenopus laevis</i>)	Poisson-zèbre	Poulet	Souris		
Génome séquencé	Le génome de l'espèce diploïde X. <i>tropicalis</i> a été séquencé	Oui	Oui	Oui		
Mutations spontanées	Non	Oui	Oui	Oui		
Mutations induites (sélection de mutations)	Oui	Oui (voir Encart 3C)	Non	Oui		
Extinction génique ou <i>knock-out</i> de gènes dans des cellules somatiques	Extinction génique par des ARN morpholinos antisens (MOs) (Encart 6B)		Mise sous silence de gènes par MOs et interférence à ARN (ARNi) (Encart 6B)	<i>Knock-out</i> génique par le système Cre/ <i>loxP</i> (qui nécessite de faire d'abord des animaux transgéniques ; Encart 3D)		
<i>Knock-out</i> de gènes dans la lignée germinale (animaux transgéniques)	Non	Oui	Pas encore	Oui		
Mutation gain de fonction (ex : mauvaise expression ou expression ectopique) de gènes spécifiques dans la totalité de l'embryon	Par injections d'ARNm dans l'œuf fécondé ou dans l'embryon très précoce (voir par exemple Fig. 4.6)		Pas encore possible en routine mais des poulets transgéniques ont été produits (Fig. 3.37)	Des souris transgéniques avec des mutations gain de fonction peuvent être produites		
Ciblage de la surexpression ou de la mauvaise expression de gènes dans le temps et l'espace	L'expression peut être ciblée dans une certaine mesure en injectant des ARN dans certains blastomères	Non	Oui dans des tissus somatiques	Des souris transgéniques avec une expression inductible ou avec des types cellulaires exprimant spécifiquement un transgène peuvent être produites		
Cellules souches embryonnaires pouvant être cultivées puis différenciées <i>in vivo</i>	Non	Non	Oui	Oui. Des souris transgéniques mutantes peuvent être produites en utilisant des cellules ES mutées par recombinaison homologue (voir Section 3.10 et Chapitre 8)		

Fig. 3.38 La pertinence des différents modèles de vertébrés pour l'étude du développement basée sur la génétique.

dérivées de la masse cellulaire interne d'un blastocyste de souris (Chapitre 8). Pouvant être maintenues indéfiniment en culture, multipliées en grand nombre, elles sont étudiées pour leur utilisation potentielle en médecine régénérative.

Les cellules ES injectées dans la cavité d'un jeune blastocyste s'incorporent à la masse cellulaire interne. Quand le blastocyste est ensuite introduit chez la mère de substitution pour continuer son développement, les cellules ES intégrées dans la masse cellulaire interne peuvent contribuer à la formation de tous les tissus de la souris, et même former des cellules de la lignée germinale et des gamètes. Par exemple, si des cellules ES d'une souris brune sont introduites dans la masse cellulaire interne d'un blastocyste de souris blanche, la souris qui se développe à partir de cet embryon sera une chimère faite de cellules avec le génotype des cellules ES et d'autres avec le génotype des cellules du blastocyste. Sur la peau, ce mosaïcisme sera détectable grâce aux taches de poils blancs et bruns (Fig. 3.39).

Pour former des souris transgéniques avec une mutation donnée, les cellules ES sont génétiquement manipulées lors de leur croissance en culture, et ces cellules modifiées sont introduites dans la masse cellulaire interne d'un blastocyste (Fig. 3.39). Les mutations sont ciblées sur un gène donné par la technique de recombinaison homologue dans laquelle des constructions d'ADN spécialement adaptées sont introduites dans la cellule par transfection. L'insertion dans le génome d'une molécule d'ADN transfectée est en général aléatoire, mais en ajoutant certaines séquences homologues au gène cible, il est possible de viser un site particulier pour cette insertion (Fig. 3.40). La recombinaison homologue entre l'ADN transfecté et le gène cible dans les cellules ES est à l'origine d'une insertion rendant le gène cible non fonctionnel. La mutagenèse insertionnelle a été la façon principale de produire des mutants perte de fonction, la recombinaison homologue fonctionnant particulièrement bien chez la souris. L'ADN à introduire doit porter une homologie de séquence assez grande avec sa cible pour s'intégrer dans au moins quelques cellules de la culture de cellules ES. L'ADN introduit porte généralement un gène de résistance à un produit toxique de telle sorte que les cellules contenant l'insertion peuvent être sélectionnées en ajoutant le produit toxique, qui tue les autres cellules, qui sont elles, non modifiées. Quand un gène est remplacé par un autre gène fonctionnel en utilisant ces techniques, on parle de mutant gain de fonction (knock-in).

Parce que les animaux produits par des transferts de cellules ES sont des chimères contenant à la fois des cellules génétiquement modifiées et des cellules normales, ils

peuvent présenter ou pas quelques effets de la mutation. Cependant, si les cellules ES portant le gène mutant ont été intégrées dans la lignée germinale, les souches de souris transgéniques hétérozygotes pour le gène modifié peuvent être croisées en retour pour produire des homozygotes viables ou non, en fonction du gène altéré. Des exemples de pertes de fonction de gène chez des souris seront vus avec l'étude des fonctions des gènes Hox lors la mise en place du mésoderme des somites et du tube neural (Chapitres 5 et 12). Des stratégies, tel le système Cre*/loxP*, ont été développées pour cibler des pertes de fonction de gènes dans des tissus spécifiques et/ou à des moments précis du développement (Encart 3D).

Des embryons de souris transgéniques exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du système Cre/*loxP*, lié à un promoteur adéquat ou dans un groupe donné de cellules, sont commodes pour suivre un lignage cellulaire. Ces techniques, affinées en permanence pour augmenter la résolution, sont en particulier utiles pour tracer les lignages cellulaires au cours des dernières étapes de l'embryogenèse, tels le développement d'organes, le développement du système nerveux et le comportement cellulaire d'épithé-liums à renouvellement cellulaire permanent, comme au niveau de la peau ou du tube digestif (Section 8.12). L'analyse des lignées cellulaires clonales est désormais possible en utilisant une souris transgénique chez laquelle une recombinase Cre inductible par un agent chimique, liée au gène rapporteur *lacZ* (Encart 1D) ou *GFP*, est exprimée dans toutes les cellules. La souris gravide peut être traitée avec une dose adaptée de l'agent chimique de manière à induire un faible taux de recombinaison, et des clones de cellules marquées sont formés dans l'embryon. Cette stratégie a permis la découverte des compartiments dorso-ventraux du membre de souris en développement (Chapitre 11).

De nouvelles méthodes récentes pour générer des mutations ciblées reposent sur la spécificité de l'ingénierie dans des transgènes qui codent des nucléases coupant l'ADN, les **nucléases à doigt de zinc**, (ou **ZFN** pour *Zinc Finger Nuclease*), et **TALENS** (pour *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*), ou des ARN qui guident les nucléases pour leur coupure de l'ADN, le **système CRISPR/Cas9** (pour *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*), et à leur utilisation pour couper et perturber l'expression des gènes choisis. Cas9 (protéine associée à CRISPR) est une nucléase initialement dérivée d'une bactérie qui utilise des ARN-guides codés par les arrangements des séquences CRISPR pour diriger l'enzyme vers son gène cible. Les arrangements CRISPR et le gène *Cas9* ont été adaptés pour être utilisés comme transgènes pouvant être exprimés dans les cellules de mammifère, et les arrangements peuvent être conçus pour fournir des ARN-guides qui adressent la nucléase Cas9 vers des gènes spécifiques.







Fig. 3.40 Production de cellules ES de souris mutantes par recombinaison homologue. Le gène ciblé pour être inactivé (knock-out en anglais) est d'abord cloné avant d'y insérer un gène de résistance à un médicament ou autre gène de sélection, ce qui rend aussi le gène ciblé non-fonctionnel. Quand le gène modifié est introduit dans les cellules murines ES en culture, il subit une recombinaison homologue avec le gène correspondant dans un petit nombre de cellules ES. Ces dernières peuvent être sélectionnées par leur résistance au médicament avant d'être introduites dans le blastocyste d'une souris normale où elles pourront contribuer à la formation de tous les tissus de la souris en développement.

ENCART 3D Le système Cre/loxP: une stratégie pour invalider des gènes chez la souris

Une façon très puissante et largement utilisée de cibler l'invalidation d'un gène dans un tissu spécifique et/ou à un moment particulier du développement, est fournie par le système Cre/loxP (Figure 1). Le gène cible est d'abord « floxé » en insérant une séquence loxP de 34 paires de bases de chaque côté du gène (« floxé », signifiant « flangué par des séguences lox »). Cette cible utilise la recombinaison homologue dans des cellules ES en culture (Section 3.10). Des souris transgéniques sont ensuite produites en introduisant les cellules ES dans des blastocystes (Fig. 3.39) et en sélectionnant des lignées de souris transgéniques homozygotes portant toutes le gène. La lignée de souris avec le gène « floxé » est alors croisée avec une autre lignée de souris transgéniques portant le gène de la recombinase Cre. La Cre



reconnaît les séquences *loxP* et excise la séquence contenue entre les deux sites *loxP*. Si la Cre est produite dans toutes les cellules de la descendance, la cible « floxée » sera excisée dans toutes les cellules, causant une invalidation du gène cible dans toutes les cellules. Cependant, si le gène *Cre* est sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un tissu, pour que le gène ne s'exprime, par exemple, que dans le tissu cardiaque, le gène cible ne sera excisé que dans le tissu cardiaque (Figure 1). Si le gène *Cre* est associé à une région de contrôle inductible, il est possible de déclencher l'excision du gène cible sur commande en exposant les souris au stimulus inducteur (Figure 1).

La technologie Cre/*loxP* permet d'inactiver des gènes, mais peut aussi être utilisée pour cibler des promoteurs, de sorte que le gène associé est activé en permanence. C'est ce qui est réalisé en activant le gène rapporteur de la *GFP* ou de *lacZ*, pour étudier le lignage cellulaire chez la souris à un stade précis du développement. La descendance des cellules marquées pourra ensuite être repérée à des stades plus tardifs du développement ou après la naissance.

Ces nouvelles méthodes fonctionnent non seulement sur les cellules ES de souris mais sont aussi directement applicables sur des zygotes de souris. Un avantage du système CRISPR/Cas9 est qu'il peut induire des mutations dans plusieurs gènes à la fois en incluant les séquences de plusieurs ARN-guides dans le transgène. Il est ainsi possible chez la souris de produire des doubles mutants en une seule étape. La même approche fonctionne aussi chez le poisson-zèbre. Des nucléases à doigt de zinc ont été utilisées, par exemple, pour cibler le gène *No-tail (ntl)*, la version chez le poisson-zèbre du gène *brachyury*. Comme *brachyury* chez la souris (Fig. 1.12), *No-tail* est requis pour la formation de la queue. Environ 30 % des embryons de poisson-zèbre injectés au stade une-cellule avec un ARNm pour la ZFN spécifique de *ntl* sont dépourvus de queue, montrant que *ntl* est devenu non fonctionnel.

Un grand nombre de mutations perte de fonction sur un seul gène donne des souris qui se développent sans anomalie évidente ou conduisent à des anomalies moins sévères que celles attendues d'après l'activité normale du gène. Un exemple flagrant est fourni par *myoD*, un gène clé dans la différenciation musculaire décrite Chapitre 8. Chez les mutants perte de fonction *myoD*, les souris ont une anatomie normale mais un taux de survie réduit. L'explication la plus plausible de ce résultat

est que le processus de différenciation musculaire présente une certaine redondance et que d'autres gènes peuvent se substituer à *myoD* pour certaines de ses fonctions (Section 8.5).

Cependant, il est inenvisageable qu'un gène donné puisse être inutile à l'organisme. Il est bien plus probable que le phénotype de ces animaux apparemment normaux soit altéré mais de façon trop discrète pour être détectée dans les conditions artificielles de la vie en laboratoire. Ainsi la redondance serait plus apparente que réelle. Une complication supplémentaire réside dans la possibilité que des gènes proches, dotés de fonctions similaires, puissent dans certaines circonstances, accroître leur activité pour compenser l'absence du gène muté.

3.11 La fonction d'un gène peut aussi être testée par transgenèse transitoire et par extinction génique

Il existe d'autres moyens pour altérer l'expression des gènes, la production de souris transgéniques étant un processus assez coûteux. Les techniques de **transgenèse transitoire** ou **transgenèse somatique** sont d'exécution plus simple et moins onéreuses, et sont en particulier précieuses chez les amphibiens et le poulet, chez lesquels la transgenèse de la lignée germinale n'a pas été réalisable. Le jeune embryon de xénope a de grands blastomères et est très adapté pour des expériences dans lesquelles l'ARNm d'un gène supposé avoir un rôle dans le développement, est injecté dans un blastomère spécifique pour voir les effets de sa surexpression. L'injection d'ARNm est aussi utilisée chez le xénope et d'autres embryons pour voir si un gène donné peut rétablir un développement normal après l'ablation d'une région de l'embryon précoce ou l'extinction du propre gène de l'embryon. Des expériences de ce type sont décrites au Chapitre 4.

La trangenèse transitoire pour une surexpression ou une mauvaise expression de gènes à court et long terme est aussi largement utilisée pour étudier la fonction de gènes dans l'embryon de poulet. Pour l'expression à court terme, les gènes sont délivrés dans les cellules par électroporation (Section 3.7). Pour une surexpression à long terme, le gène est inséré dans un vecteur retroviral compétent pour la réplication avant d'être injecté dans l'embryon. Les cellules infectées expriment le gène inclus dans le cycle de réplication viral et au fur et à mesure que le virus se réplique, il transmet le gène aux cellules voisines.

L'équivalent transitoire de l'invalidation génique est la technique de d'extinction génique ou gene knockdown, dans laquelle un gène n'est pas muté ou retiré du génome mais son expression est supprimée ou interrompue en ciblant ses ARNm et en empêchant leur traduction. Les techniques permettant cette extinction sont décrites Encart 6B. Parce qu'il n'est pas possible de générer des mutations perte de fonction chez les embryons de xénope et de poulet, l'extinction de gènes par injection d'ARN antisens morpholino est en particulier utile et cette technique est très utilisée aussi chez le poisson-zèbre. Les morpholinos sont des ARN stables conçus pour être complémentaires d'un ARNm spécifique. Introduits dans les cellules d'un embryon, ils s'hybrident à l'ARNm cible, empêchant ainsi sa traduction en protéine. L'injection d'un morpholino dans un zygote de xénope inactivera l'expression du gène dans toutes les cellules du jeune embryon. L'électroporation de morpholinos dans les cellules de jeunes embryons de poulet produira une inactivation locale. La technique de l'interférence à ARN (ARNi), aussi décrite Encart 6B, est utilisée en embryologie. Dans ce cas, les petits ARNi de séquence définie agissent comme des guides ARN spécifiques pour cibler une nucléase cible pertinente de l'ARNm qui est ensuite dégradé. Des constructions d'ARNi interagissant avec les ARN ont été introduites par électroporation dans le tube neural d'embryons de poulet pour supprimer l'expression de gènes.

3.12 Les réseaux de régulation de gènes dans le développement embryonnaire peuvent être révélés par des techniques d'immunoprécipitation de chromatine

Une approche puissante pour étudier le développement est obtenue en combinant la bioinformatique et la biologie moléculaire et cellulaire expérimentale pour décrire le réseau d'interactions entre les gènes et leurs facteurs de



Fig. 3.41 ChIP-chip et ChIP-seq. Ces deux variantes de l'immunoprécipitation de la chromatine sont utilisées pour découvrir les sites de liaison sur l'ADN de facteurs de transcription et d'autres protéines de liaison à l'ADN. Après la liaison croisée covalente de toute protéine liée à l'ADN par traitement chimique, l'ADN est fragmenté et traité avec un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt. Le complexe immun est purifié et l'ADN extrait. Il est alors amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) et ensuite analysé par des puces à ADN (ChIP-chip) ou par séquençage de l'ADN (ChIP-seq).

transcription, et identifier ainsi des **réseaux régulateurs de gènes** sous-tendant un processus donné du développement. Une fois connue la séquence génomique d'un animal, l'immunoprécipitation de la chromatine suivie de l'analyse par puces à ADN (**ChIP-chip** pour *Chromatin Immunoprecipitation*), permet d'identifier les gènes auxquels se lie un facteur de transcription donné *in vivo* (Fig. 3.41).

À un stade donné de développement, les embryons sont traités pour que les protéines associées aux éléments régulateurs cis de l'ADN se lient de façon covalente à l'ADN. L'ADN est alors isolé et coupé en petits fragments traités par un anticorps spécifique d'un facteur de transcription donné. Ceci précipite (pull down) tous les fragments d'ADN auxquels est lié le facteur de transcription dans les cellules de l'embryon. L'ADN peut être identifié en digérant les protéines liées, en marquant le segment d'ADN et en l'hybridant sur des puces à ADN (Encart 3B) contenant les séquences génomiques situées en amont des gènes connus, et donc susceptibles d'inclure des séquences régulatrices. Une alternative est de séquencer l'ADN libéré des protéines, par une technique appelée ChIP-seq. Le gène associé à ces séquences régulatrices peut être identifié en interrogeant les bases de données d'ADN génomique. La technique du « ChIP-seq » a été utilisée, par exemple, pour identifier les gènes ciblés par les facteurs de transcription Ntl (pour No-tail, sans queue), l'équivalent chez le poisson-zèbre de Brachyury, au stade mi-gastrula d'embryons de poisson-zèbre, et ainsi mettre à jour le réseau régulateur de l'expression génique impliqué dans la spécification et l'organisation du mésoderme chez cet animal modèle. D'autres réseaux régulateurs de l'expression génique sont également en voie d'être identifiés, en aval des facteurs de transcription Gli qui contrôlent la signalisation Shh dans les membres en développement (Chapitre 11) et le tube neural (Chapitre 12).

Résumé du Chapitre 3

- Tous les vertébrés ont un plan d'organisation similaire. Les structures caractéristiques des vertébrés sont la colonne vertébrale qui entoure la moelle épinière et le crâne osseux ou cartilagineux qui forme la tête et entoure le cerveau.
- Le corps d'un vertébré présente trois axes principaux de symétrie, l'axe antéro-postérieur de la tête à la queue, l'axe dorso-ventral du dos au ventre et l'axe latéral avec une symétrie bilatérale de part et d'autre du plan médian de telle sorte que, vus de l'extérieur, les côtés droit et gauche sont des images en miroir l'un de l'autre. Certains organes internes tels les poumons, les reins et les gonades sont aussi présents comme structures paires symétriques même si leur position et leur morphologie peuvent différer entre côté droit et gauche. Des organes en exemplaire unique comme le cœur ou le foie sont disposés de façon asymétrique par rapport à la ligne médiane dorsale.
- Les embryons précoces de vertébrés passent tous par une série de stades de développement, segmentation (clivage), gastrulation et neurulation, pour former des embryons qui se ressemblent tous à un stade nommé stade phylotypique.
- Il existe des différences considérables dans le développement des différents organismes modèles avant le stade phylotypique, en rapport avec le moment et le lieu de mise en place des axes et le moment où les feuillets embryonnaires sont établis. Ces différences découlent surtout des différents modes de reproduction des animaux, ce qui affecte la quantité de vitellus dans l'ovule et par conséquent la forme du tout jeune embryon.
- Les structures typiques des différents groupes de vertébrés comme les nageoires, les becs, les ailes et la queue, se forment après le stade phylotypique.
- Le plan d'organisation du corps et les ébauches des organes sont mis en place alors que l'embryon est encore de très petite taille. L'accroissement de taille a lieu à des stades ultérieurs.

- Les mécanismes sous-tendant le développement peuvent être étudiés en perturbant le processus de développement normal de façon spécifique et en observant les conséquences.
- Les techniques permettant d'interférer avec le développement sont globalement de deux types : les techniques d'embryologie expérimentale basées sur la manipulation de l'embryon en enlevant ou ajoutant des cellules à des embryons en cours de segmentation ou en greffant des blocs de cellules d'un embryon à un autre, et les techniques basées sur la génétique qui perturbent l'expression des gènes importants dans le développement suite à des mutations, des extinctions ou surexpressions induites.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Les vertébrés partagent tous un certain nombre de caractéristiques : quelles sont-elles ? En se référant à la Fig. 3.2, identifier ces caractéristiques dans la rangée des illustrations montrant le stade phylotypique.

2. Après fécondation, tous les embryons subissent la segmentation (ou clivage). Chez l'embryon de xénope, quelle est la relation entre l'axe animal-végétatif et le plan des trois premières divisions de segmentation ? Décrire en quoi le clivage chez l'embryon de poulet diffère de celui observé chez la grenouille ou la souris ; quelle est l'origine de ces différences ?

3. Comparer les termes blastula, blastoderme et blastocyste. À quels organismes ces termes s'appliquent-ils ? Quelles caractéris-tiques partagent-ils et en quoi diffèrent-ils ?

4. La gastrulation chez le xénope conduit à la mise en place des trois feuillets embryonnaires par un processus d'involution. Quels sont les trois feuillets embryonnaires et quelle est leur relation les uns avec les autres dans la gastrula tardive (stade 12) ? Qu'est-ce que l'archentéron, et que devient-il ?

5. Faire la distinction entre les régions suivantes de l'embryon de poulet : épiblaste et hypoblaste ; zone marginale postérieure, croissant de Koller et nœud de Hensen ; endoblaste et endoderme ; mésenchyme et mésoderme.

6. Le nœud de Hensen de l'embryon de poulet en gastrulation est l'analogue du blastopore de l'embryon de xénope mais, malgré cette analogie, plusieurs différences existent entre ces deux structures. Détailler les différences suivantes : (a) l'immigration des cellules chez le poulet *versus* l'involution des cellules chez la grenouille ; (b) le mouvement du nœud de Hensen chez le poulet *versus* l'absence de mouvement du blastopore.

7. Lors de la neurulation de l'embryon de poulet, les précurseurs de plusieurs structures adultes se forment. Quelles sont les structures qui dérivent : de la plaque neurale ; des somites ; du mésoderme intermédiaire ; du mésoderme splanchnique ; de la chorde ? (voir Fig. 3.17.)

8. Faire la distinction entre la masse cellulaire interne et le trophectoderme chez l'embryon de souris. Indiquer les grandes lignes des événements qui conduisent à la formation de l'épiblaste et de la ligne primitive.

9. Quelles sont les caractéristiques qui font d'une espèce animale un bon organisme modèle pour l'étude du développement ? Par exemple, quelles caractéristiques font du poulet un modèle intéressant pour l'étude du développement, comparé à la grenouille ? Au contraire, quels sont les avantages offerts par la souris comparée au poulet ?

10. Résumer brièvement les étapes de la production de souris transgéniques et de souris porteuses d'une inactivation génique (ou *knock-out*) en utilisant des cellules souches embryonnaires. En quoi les deux processus diffèrent, à la fois dans les techniques impliquées et dans les résultats ?

11. Un gène particulier codant un facteur de transcription vient d'être découvert, et il est exprimé dans le foie à un certain stade du développement chez les embryons de souris et de poulet. Comment sa fonction peut-elle être révélée ? Décrire les expériences devant être menées chez ces deux organismes modèles.

QCM

NB Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.

1. À quel moment de son cycle de vie une grenouille ressemble-telle le plus à un mammifère ?

- a) blastula
- b) stade phylotypique
- c) gastrulation
- d) zygote

2. L'extrémité sombre pigmentée d'un ovocyte de xénope est appelée :

- a) dorsale
- b) pôle animal
- c) pôle végétatif
- d) vitellus

3. Laquelle des propositions suivantes indique l'ordre correct des stades de développement précoce de la grenouille ?

- a) blastula, zygote, gastrula, neurula
- b) segmentation, gastrulation, neurulation, organogenèse
- c) neurulation, gastrulation, segmentation, organogenèse
- d) têtard, embryon, neurula, gastrula
- 4. La segmentation chez le poisson-zèbre est à l'origine
- a) du stade 14-somites
- b) de la gastrula
- c) du stade sphère
- d) du stade écusson

5. À quelle structure chez les amphibiens la ligne primitive des embryons de souris et de poulet est-elle analogue ?

- a) l'archentéron
- b) le blastocœle
- c) le blastopore
- d) les replis neuraux

- 6. Au stade blastocyste, l'embryon de mammifère est constitué
- a) d'un blastocœle, de vitellus et des cellules du pôle animal
- b) d'un épiblaste reposant sur un hypoblaste
- c) de cellules ectodermiques, mésodermiques et endodermqiues
- d) d'un trophectoderme et d'une masse cellulaire interne

7. Tous les gènes exprimés dans un tissu donné ou à un stade particulier du développement peuvent être identifiés en utilisant :

- a) une hybridation *in situ*
- b) une mutagenèse insertionnelle
- c) des puces à ADN
- d) des nucléases à doigt de zinc

8. Les avantages de l'utilisation du système Cre/*loxP* pour une mutagenèse dirigée sont

- a) un gène peut être supprimé dans un tissu particulier ou à un moment spécifique du développement
- b) le système Cre/*loxP* permet la transgenèse dans la lignée germinale des amphibiens et du poulet
- c) le système Cre/*loxP* est plus spécifique que la méthode de recombinaison homologue
- d) la délétion d'un gène par le système Cre/loxP est réversible

9. L'organisme modèle le moins favorable pour des études génétiques classiques est

- a) la drosophile
- b) la souris
- c) le xénope
- d) le poisson-zèbre

10. L'électroporation est

- a) la fusion de cellules adjacentes sous une impulsion électrique
- b) l'injection d'un gène dans le noyau d'une cellule
- c) l'introduction d'un marqueur de lignage fluorescent dans des cellules
- d) l'utilisation de brèves impulsions électriques pour que des cellules incorporent de l'ADN

Réponses aux QCM

1 : b, 2 : b, 3 : b, 4 : c, 5 : c, 6 : d, 7 : c, 8 : a, 9 : c, 10 : d.

Références bibliographiques générales

- Bard, J.B.L.: *Embryos. Color Atlas of Development*. London: Wolfe, 1994.
- Carlson, B.M.: *Patten's Foundations of Embryology*. New York : McGraw-Hill, 1996.

Descriptions des stades de développement des embryons de grenouille, poisson zèbre, poulet et souris

- Xenopus: stades de développement : Xenbase Nieuwkoop and Faber stage series [http://www.xenbase.org/xenbase/original/ atlas/NF/NF-all.html] (consulté le 15 janvier 2017) ; films de la segmentation et de la gastrulation [http://www.xenbase.org] (consulté le 15 janvier 2017)
- Zebrafish: stades de développement : Karlstrom Lab ZFIN Embryonic Developmental Stages [https://zfin.org/ zf_info/zfbook/stages/] (consulté le 20 avril 2017) ; film du développement : Karlstrom, R.O., Kane, D.A.: A flipbook of zebrafish embryogenesis. *Development* 1996, 123 : 1–461; Karlstom Lab [http://www.bio.umass.edu/biology/karlstrom/] (consulté le 15 janvier 2017)

- **Poulet :** liste et description des stades de développement d'Hamilton & Hamburger : UNSW Embryology – Chicken Developmental Stages [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index. php/Chicken_stages] (consulté le 20 avril 2017).
- **Souris:** Edinburgh Mouse Atlas Project [http://www.emouseatlas. org] (consulté le 15 janvier 2017).
- Human: L'embryon humain multidimensionnel [http://embryo. soad.umich.edu] (consulté le 15 janvier 2017) ; UNSW
 Embryologie : stade de Carnegie des embryons humains [http://embryology.med.unsw.edu.au] (consulté le 15 Janvier 2017).

Références bibliographiques spécifiques

3.1 Le crapaud *Xenopus laevis* est l'amphibien modèle pour l'étude du développement du plan d'organisation.

- Hausen, P., Riebesell, H. : *The Early Development of* Xenopus laevis. Berlin : Springer-Verlag, 1991.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J. : *Normal Tables of* Xenopus laevis. Amsterdam: North Holland, 1967.

3.2 L'embryon de poisson-zèbre se développe autour d'une grande masse de vitellus

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling,
T.F. : Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 1995, 203: 253–310.

Warga, R.M., Nusslein-Volhard, C.: Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development* 1999, 26 : 827–838.

Westerfield, M. (Ed.) : *The Zebrafish Book* ; A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Brachydanio rerio). Eugene, Oregon: University of Oregon Press, 1989.

3.4 Le jeune embryon de poulet se développe en un disque plat de cellules surplombant une masse de vitellus

Bellairs, R., Osmond, M. : *An Atlas of Chick Development* (2nd edn). London: Academic Press, 2005.

Chuai, M., Weijer, C.J. : The mechanisms underlying primitive streak formation in the chick embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2008, **81**: 135–156.

Hamburger, V., Hamilton, H.L. : A series of normal stages in the development of a chick. *J. Morph.* 1951, **88** : 49–92.

Lillie, F.R. : Development of the Chick : An Introduction to Embryology. New York : Holt, 1952.

Patten, B.M. : *The Early Embryology of the Chick*. New York : McGraw-Hill, 1971.

Stern, C.D. : **Cleavage and gastrulation in avian embryos** (version 3.0). *Encyclopedia of Life Sciences* 2009, http://www. els.net/.

3.5 Le zygote de souris est dépourvu de vitellus et son développement précoce implique des cellules dédiées à la formation du placenta et des membranes extraembryonnaires

Cross, J.C., Werb, Z., Fisher, S.J. : **Implantation and the placenta : key pieces of the developmental puzzle**. *Science* 1994, **266** : 1508–1518.

Hu, D., Cross J.C. : **Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta**. *Int. J. Dev. Biol.* 2010, **54** : 341–354. Kaufman, M.H. : *The Atlas of Mouse Development* (2nd edition). London : Academic Press, 1992.

Kaufman, M.H., Bard, J.B.L. : *The Anatomical Basis of Mouse Development*. London : Academic Press, 1999.

3.6 Le développement précoce de l'embryon humain est similaire à celui de la souris

Drews, U. : *Color Atlas of Embryology*. Stuttgart and New York : Thieme, 1995.

Niakan, K.K., Han, J., Pedersen, R.A., Simon, C., Pera, R.A.R. : Human pre-implantation embryo development. *Development* 2012, **139** : 829–841.

Schoenwolf, G.C., Belyl, S.B., Brauer, P.R., Francis-West, P.H. : *Larsen's Human Embryology* (4th edn). London and New York : Churchill Livingstone, 2008.

Zhu, Z., Huangfu, D. : Human pluripotent stem cells : an emerging model in developmental biology. Development 2013, 140 : 705–717.

Approches expérimentales pour étudier le développement des vertébrés

Dale, L., Slack, J.M. : Fate map for the 32-cell stage of Xenopus laevis. *Development* 1987, 99 : 527–551.

Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Amacher, S.L. : Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2008, 26 : 702–708.

Hogan, H., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. : *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual* (2nd edn). New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

- McGrew, M.J., Sherman, A., Ellard, F.M., Lillico, S.G., Gilhooley, H.J., Kingsman, A.J., Mitrophanous, K.A., Sang, H. : Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. EMBO Rep. 2004, 5 : 728–733.
- Sharpe, P., Mason, I. : *Molecular Embryology Methods and Protocols* (2nd edn). New York : Humana Press ; 2008.

Southall, T.D., Brand, A.H. : Chromatin profiling in model organisms. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* 2007, 6 : 133–140.

Stern, C.D. : The chick : a great model system just became even greater. *Dev. Cell* 2004, 8 : 9–17.

Tabata, H., Nakajima, K. : Efficient *in utero* gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation : visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* 2001, **103** : 865–872.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., Jaenisch, R. : One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013, 153 : 910–918.

Zernicka-Goetz, M., Pines, J., Ryan, K., Siemering, K.R., Haseloff, J., Evans, M.J., Gurdon, J.B. : An indelible lineage marker for *Xenopus* using a mutated green fluorescent protein. *Development* 1996, **122** : 3719–3724.

ENCART 3A Diagnostic pré-implantatoire

Brezina, P.R., Brezina, D.S., Kearns, W.G. : **Preimplantation** genetic testing. *BMJ* 2012, **345** : e5908.

ENCART 3B Profils d'expression de gènes par micropuces d'ADN et ARN seq

Hamatani, T., Carter, M.G., Sharov, A.A., Ko, M.S. : **Dynamics** of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev. Cell* 2004, 6 : 117–131.

Malone, J.H., Oliver, B. : Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.* 2011, 9 : 34–43.

Vassena, R., Boué, S., González-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A., Izpisúa Belmonte, J.C. : Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 2011, 138 : 3699–3709.

ENCART 3C Mutagenèse à large échelle chez le poisson zèbre

Lawson, N.D., Wolfe, S.A. : Forward and reverse genetic approaches for analysis of vertebrate development in the zebrafish. *Dev. Cell* 2011, **21** : 48–64.

Stemple, D. : Tilling — a high throughput harvest for functional genomics. Nat. Rev. Genet. 2004, 5 : 1–6.

ENCART 3D le système Cre/*loxP* : une stratégie pour obtenir des mutants pertes de fonction chez la souris

- Menke, D.B. : Engineering subtle targeted mutations into the mouse genome. *Genesis* 2013, **51** : 605–618.
- Yu, Y., Bradley, A. : Engineering chromosomal rearrangements in mice. Nat. Rev. Genet. 2001, 2 : 780–790.

4

Développement des vertébrés II: xénope et poisson-zèbre

- Mise en place des axes corporels
- Origine et spécification des feuillets embryonnaires
- Centre organisateur de Spemann et induction neurale
- Mise en place des structures corporelles chez le poisson- zèbre

Ce chapitre décrit les stades les plus précoces du développement du xénope (Xenopus) considéré comme modèle de vertébré. Il traite des différentes étapes qui permettent à l'embryon de passer du stade d'œuf fécondé à un stade où il présente des axes bien définis et des feuillets embryonnaires spécifiés. Seront considérés en premier, les rôles relatifs de facteurs maternels préexistant dans l'œuf et le programme de développement autonome de l'embryon conduisant à la formation des axes corporels. Le processus de mise en place des trois feuillets embryonnaires primordiaux ectoderme, mésoderme, et endoderme - sera ensuite détaillé, celui-ci constituant une phase cruciale du développement des vertébrés. La formation du centre organisateur de Spemann sera également abordée ainsi que le rôle de ce dernier dans la mise en place du schéma corporel en fonction des axes dorso-ventral et antéro-postérieur. Cette mise en place dépend d'une série de signaux provenant du centre organisateur lui-même ou d'autres régions de l'embryon qui fournissent des informations de position aux cellules. Au cours du processus de gastrulation, suite à leur formation initiale, les feuillets embryonnaires primordiaux vont se déplacer vers les positions qui leur sont assignées selon le plan corporel défini. La gastrulation s'accompagne d'un événement important, celui de l'induction du système nerveux à partir de l'ectoderme dorsal, suite à une cascade complexe de signaux provenant des tissus adjacents, notamment du centre organisateur. Il sera également envisagé, à la suite du xénope, comment le plan corporel se met en place chez un autre vertébré, le poisson-zèbre.

Le développement des vertébrés se déroule selon les orientations données par les axes antéro-postérieur (de la tête à la queue) et dorso-ventral (du dos au ventre) comme déjà souligné au Chapitre 3. Dans ce chapitre, seront abordés en détail les mécanismes responsables de l'établissement du schéma corporel chez les vertébrés. La première étape consiste précisément en l'établissement des deux axes, et la seconde en la spécification et l'organisation des feuillets embryonnaires primordiaux, en particulier l'induction du mésoderme, suivant l'axe dorso-ventral. L'organisation de l'embryon suivant l'axe antéro-postérieur sera ensuite examinée, ainsi que l'induction du système nerveux présomptif à partir de l'ectoderme, avec comme modèle le xénope. Celui-ci est considéré en premier car plusieurs des découvertes majeures du développement



embryonnaire précoce ont été faites chez les embryons d'amphibiens. Une fois examinés les processus permettant la mise en place des structures corporelles chez le xénope, puis chez le poisson-zèbre chez lequel ces processus sont similaires, cette mise en place sera abordée chez les embryons de poulet et de souris au Chapitre 5.

Chez les amphibiens, la spécification des axes et celle des feuillets embryonnaires sont déjà en partie réalisées sous l'effet de facteurs cytoplasmiques déposés dans l'œuf par la mère pendant l'ovogenèse. Certains facteurs maternels dans la région animale de l'œuf de xénope spécifient cette région comme celle du futur ectoderme, d'autres présents dans la région végétative spécifiant cette dernière en endoderme présomptif. Le mésoderme présomptif, en revanche, n'est produit qu'une fois le développement déjà engagé, grâce à l'action de signaux produits par des cellules végétatives et agissant sur des cellules animales adjacentes. Cette action spécifie une bande de mésoderme présomptif au niveau de la région équatoriale de la blastula. La blastula se développant, le futur mésoderme va se diversifier le long de l'axe dorso-ventral et présenter des régions ayant des potentialités de différenciation distinctes. Pendant la gastrulation, les feuillets embryonnaires primordiaux ectoderme, mésoderme, endoderme- se déplacent pour occuper des positions à partir desquelles ils se développeront en structures larvaires. L'axe antéro-postérieur se manifeste clairement avec la formation de la tête et de la future queue (Fig. 4.1). De plus, l'ectoderme dorsal est spécifié en tissu nerveux. Le centre organisateur de Spemann qui apparaît au début de la gastrulation, est un centre de signalisation qui possède des fonctions organisatrices générales. Il coordonne l'organisation des structures le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral et induit la formation de tissu nerveux. Les mécanismes liés aux mouvements des cellules et des tissus pendant la gastrulation chez le xénope seront abordés au Chapitre 9.

Mise en place des axes embryonnaires

Nous allons d'abord considérer la manière dont sont établis l'axe antéro-postérieur et l'axe dorso-ventral chez le xénope, et jusqu'à quel point l'embryon est organisé par avance par des facteurs cytoplasmiques d'origine maternelle déposés dans l'ovocyte au cours de sa maturation dans l'ovaire. La fécondation est rapidement suivie par une étape cruciale : la spécification d'un des côtés de l'œuf fécondé comme la future région dorsale de l'embryon, un événement qui va conditionner le développement de ce dernier.

4.1 L'axe pôle animal-pôle végétatif est déterminé maternellement chez le xénope

Les tout premiers stades du développement du xénope sont exclusivement placés sous le contrôle de facteurs maternels présents dans l'œuf. Comme il a été vu chez la drosophile (voir Chapitre 2), les facteurs maternels sont des ARNm et des protéines produits par la mère pendant l'ovogenèse et déposés dans l'ovocyte pendant sa maturation. L'ovule de xénope présente une polarisation alors même qu'il n'est pas fécondé, et sa polarité influence la façon dont il se segmente. Une des extrémités de l'œuf, le **pôle animal**, qui présente une surface très pigmentée, se présentera sur le dessus après la fécondation tandis que la plus grande partie du vitellus se positionnera Fig. 4.1 Comparaison des axes et des cartes des territoires présomptifs dans l'œuf et la blastula de xénope avec les structures de l'embryon au stade bourgeon caudal. L'œuf de xénope possède initialement un axe de symétrie joignant les deux pôles animal et végétatif (à gauche). Cette symétrie radiaire disparaît avec la spécification d'un côté dorsal chez la blastula (au centre). Après la gastrulation et la neurulation, l'embryon s'est allongé et a maintenant un axe visible antéro (tête) postérieur (queue) et un axe dorso-ventral perpendiculaire au premier (à droite). Chez le xénope, l'endoderme qui sera à l'origine du tube digestif et des organes associés, et l'ectoderme qui donnera l'épiderme et le système nerveux sont spécifiés par des déterminants cytoplasmiques maternels déjà présents dans l'œuf. Le mésoderme, dont seront issus la chorde, les somites, les éléments sanguins et d'autres organes, est induit à partir de l'ectoderme par des signaux provenant de la région végétative durant le stade blastula.

alors à l'extrémité opposée, non pigmentée, le **pôle végétatif**, sous l'influence de la gravité (voir Fig. 3.4). L'hémisphère animal contient le noyau de l'œuf, proche du pôle animal. Ces différences définissent l'**axe pôle animal-pôle végétatif** (ou axe PA-PV).

La pigmentation ne joue aucun rôle dans le développement mais est un marqueur utile permettant de distinguer les modifications spécifiques à chaque hémisphère. Les plans de clivage cellulaire qui apparaissent après la fécondation sont liés à l'axe PA-PV. Le premier plan de clivage est méridien et contient l'axe PA-PV, et souvent coïncide avec le futur plan de symétrie bilatérale divisant l'embryon en côtés gauche et droit. Le second plan de clivage, perpendiculaire au premier, contient aussi l'axe PA-PV, et divise le zygote en quatre cellules, tandis que le troisième plan de clivage est perpendiculaire à PA-PV et divise l'embryon en hémisphères animal et végétatif, chacun étant composé de quatre blastomères (voir Fig. 3.5).

Les facteurs maternels sont de toute première importance au tout début du développement du xénope car la plupart des gènes de l'embryon ne commencent à être transcrits qu'après un stade appelé transition blastuléenne, qui sera évoqué plus loin. L'ovule contient de grandes quantités d'ARNm et de protéines maternels. Il y a par exemple suffisamment de protéines histone pour la formation de 10 000 noyaux, et permettre d'assurer les 12 premiers cycles de clivage précédant le début de l'expression des gènes zygotiques. L'ovule contient également des ARNm maternels qui codent des protéines jouant un rôle particulier au cours du développement. Ces ARNm sont distribués le long de l'axe PA-PV de l'ovocyte pendant l'ovogenèse, les plus importants pour le développement se trouvant dans l'hémisphère végétatif de l'œuf mature. Si on prélève le cytoplasme de la région extrême végétative avant la première division cellulaire, l'embryon qui se développe ne forme rien de plus qu'une masse tissulaire symétrique radiale dépourvue de structures dorsales, comme la corde ou les somites, et sans axe antéro-postérieur défini.

La localisation des ARNm maternels s'établit suivant deux voies distinctes. Au début de l'ovogenèse, des ARNm sont concentrés dans le cortex du futur pôle végétatif *via* un mécanisme de transport impliquant une région cytoplasmique appelée région organisatrice du transport de messagers (METRO, pour *Message Transport Organizer region*). Celle-ci est associée au nuage mitochondrial, une fraction cytoplasmique de l'ovocyte où sont générées les mitochondries. Le processus par lequel METRO sélectionne certains ARNm pour ensuite les transporter n'est pas clair, mais pourrait impliquer l'association des ARNm avec le cytosquelette et des petites vésicules du réticulum endoplasmique. Plus tardivement au cours de l'ovogénèse, d'autres ARNm sont transportés vers le cortex végétatif *via* des microtubules et la kinésine, et ceci de façon similaire au transport des ARNm dans l'ovocyte de drosophile (voir Fig. 2.21).

L'expression des ARNm maternels importants pour le développement et présents dans l'ovule du xénope est régulée de telle sorte que, dans la plupart des cas, ils ne sont traduits qu'après la fécondation. Les protéines codées par plusieurs de ces ARNm sont responsables de signaux qui spécifient une polarité précoce et amorcent un développement ultérieur. Un ARNm maternel code la protéine de signalisation Vg-1, qui appartient à la grande famille de facteur de croissance transformant- β (TGF- β , pour Transforming Growth Factor- β) (une liste des protéines de signalisation sécrétées impliquées dans le développement précoce des vertébrés figure dans l'Encart 4A). L'ARNm vg1 synthétisé au cours de l'ovogénèse précoce se concentre dans le cortex végétatif des ovocytes matures (Fig. 4.2), après s'être déplacé dans le cytoplasme végétatif avant la fécondation. Il est traduit après la fécondation et son produit fonctionne comme un signal précoce pour certains aspects de l'induction mésodermique. Un autre ARNm végétatif code Wnt-11, un membre de la famille de protéines de signalisation des vertébrés Wnt apparentées à la protéine Wingless de la drosophile (voir Encart 4B), constitue un des premiers signaux nécessaires pour la spécification de l'axe dorso-ventral. D'autres éléments de la voie de signalisation Wnt sont également codés par des ARNm maternels ou sont déposés sous forme de protéines.

L'autre classe principale de facteurs maternels jouant un rôle dans le développement comprend les facteurs de transcription qui activent et régulent l'expression des gènes zygotiques. L'ARNm maternel du facteur de transcription à boîte T, VegT, est localisé dans l'hémisphère végétatif et est traduit après la fécondation. VegT joue un rôle clé dans la spécification de l'endoderme et du mésoderme, et sa localisation dans la région végétative est essentielle pour cette spécification.



Fig. 4.2 Distribution de l'ARNm du facteur de croissance Vg-1 dans l'œuf non fécondé d'amphibien. La localisation des ARNm maternels vg1 dans un ovocyte âgé de xénope, révélée par hybridation in situ à l'aide d'une sonde radioactive, se manifeste dans la région corticale végétative, comme l'indique la coloration jaune correspondant à des grains d'argent visualisés par un éclairage particulier. Avant que l'utilisation de marqueurs fluorescents pour la détection des acides nucléiques ne soit courante, ce type d'image était obtenu suite au dépôt d'une émulsion radiographique sur la coupe histologique une fois l'hybridation avec la sonde réalisée, la présence et la densité de la sonde radioactive déterminant la quantité des grains d'argent déposés.

Photographie aimablement communiquée par D. Melton.

ENCART 4A Signaux protéiques intercellulaires dans le développement des vertébrés

Les protéines agissant en tant que signaux intercellulaires au cours du développement des vertébrés appartiennent à sept familles principales. Certaines de ces familles, comme celle des facteurs de croissance fibroblastiques (FGF pour Fibroblast Growth Factor), ont été initialement identifiées en raison de leur rôle essentiel dans la survie et la prolifération des cellules de mammifères en culture. Les membres des sept familles sont soit sécrétés soit des protéines de signalisation transmembranaires, qui fournissent des signaux intercellulaires à de nombreux moments du développement. D'autres molécules de signalisation telles que l'insuline et les facteurs de croissance apparentés à insuline, ainsi que les neurotrophines, sont utilisées par les embryons pour certaines tâches particulières, mais les sept familles mentionnées dans le tableau (Figure 1) sont les principales impliquées au cours du développement des vertébrés. Des protéines homologues de ces protéines sont également importantes dans le développement embryonnaire des non-vertébrés (voir Chapitre 2, Chapitre 6, et exemples dans le texte).

Les molécules de signalisation listées dans le tableau agissent toutes en se fixant sur des récepteurs présents à la surface d'une cellule cible. Leur fixation produit un signal qui

est transmis, ou transduit, à travers la membrane cellulaire par le récepteur à des voies de signalisation biochimiques intracellulaires. Chaque type de protéine de signalisation a son propre récepteur ou un lot de récepteurs spécifiques, et seules les cellules possédant à leur surface les récepteurs appropriés peuvent répondre aux signaux. Les voies de signalisation intracellulaires peuvent être complexes et impliquer de nombreuses protéines différentes. Les principes généraux utilisés dans les voies de signalisation intracellulaire ont déjà été évoqués dans l'Encart 1E et les voies de signalisation Wnt/β-caténine, du TGF-β et du FGF sont respectivement illustrées dans les Encarts 4B, 4C et 4E. Les figures illustrant les autres voies de signalisation sont référencées dans le tableau. Dans un contexte de développement, les réponses importantes des cellules sont soit une modification de l'expression génique avec l'expression ou l'inactivation de gènes spécifiques, soit des modifications au niveau du cytosquelette conduisant à des changements de la morphologie ou de la mobilité cellulaire.

Protéines de signalisation intercellulaire communes dans le développement embryonnaire des vertébrés						
Familles des molécules signal	Récepteurs	Rôles dans le développement				
Facteur de croissance fibroblastique (FGF)						
Vingt-cinq gènes FGF ont été identifiés chez les vertébrés, tous n'étant pas présents chez tous les vertébrés	Récepteurs FGF du type tyrosine kinases	Rôles à tous les niveaux du développement. Maintien de la formation du mésoderme (ce chapitre). Induction de la moelle épinière (voir ce chapitre et Encart 4A pour la voie de signalisation). Signal émis par la crête apicale ectodermique dans le bourgeon de membre (Chapitre 11)				
Facteur de croissance épidermique (EGF)						
Facteur de croissance épidermique	Récepteurs EGF du type tyrosine kinases	Prolifération et différenciation cellulaire. Mise en place du patron des pattes chez la <i>drosophile</i> (Chapitre 11)				
Facteur de croissance transformant β (TGF- β)						
Grande famille de protéines incluant activine, Vg-1, protéines morphogénétiques osseuses (BMPs), Nodal et protéines apparentées à Nodal	Sous-unités du récepteur de Type I et de Type II (récepteur du type sérine/thréonine kinases). Récepteurs sous forme d'hétérodimères	Rôles à tous les niveaux du développement. Voies de signalisation dans l'Encart 4C. Induction et mise en place du patron du mésoderme (ce chapitre)				
Hedgehog						
Sonic hedgehog et d'autres membres	Patched	Signalisation de positions dans les membres et le tube neural (Chapitres 11 et 12). Voie de signalisation dans l'encart 11D. Implication dans la détermination de l'asymétrie gauche-droite chez les embryons de poulet (Chapitre 5)				
Wingless (Wnt)						
Dix-neuf gènes Wnt ont été identifiés chez les vertébrés, tous n'étant pas présents chez tous les vertébrés	Récepteurs de la famille Frizzled (sept protéines transmembranaires)	Rôles à tous les niveaux du développement. Pour les voies de signalisation canonique et non canonique voir les Encarts 48 et 4C. Spécification de l'axe dorso-ventral chez le xénope (ce chapitre). Développement du membre (Chapitre 11)				
Delta et Serrate						
Protéines de signalisation transmembranaires	Notch	Rôles à tous les niveaux du développement. Asymétrie gauche-droite (Chapitre 5). Formation des somites (voir Chapitre 5, voie de signalisation dans l'Encart 5D)				
Éphrines						
Protéines de signalisation transmembranaires	Récepteurs Eph du type tyrosine kinases	Formation des rhombomères dans le cerveau postérieur embryonnaire (Chapitre 12). Guidage des vaisseaux sanguins en formation (Chapitre 11). Guidage des axones dans le système nerveux (Chapitre 12)				

Certaines protéines de signalisation, telles que celles de la famille du facteur de croissance transformant β (TGF- β) agissent comme des dimères, deux molécules liées de façon covalente formant un complexe qui se fixe et active le récepteur, entraînant deux protéines réceptrices à former un dimère (voir Encart 4C). Dans certains cas, la forme active de la protéine de signalisation est un hétérodimère, constitué de deux membres différents de la même famille. Des molécules de signalisation sécrétées peuvent diffuser ou être transportées sur de faibles distances dans un tissu et instaurer un gradient de concentration. Certaines d'entre elles, cependant, demeurent rattachées à une surface cellulaire et ainsi ne peuvent seulement interagir qu'avec les récepteurs d'une cellule se trouvant en contact direct. Une protéine membranaire de ce type est Delta, qui interagit avec le récepteur protéique Notch présent sur une cellule voisine (voir Encart 5D, pour la voie de signalisation Notch).

À des fins d'uniformisation, il a été mis un trait d'union dans toutes les abréviations des protéines de signalisation sécrétées quand leur nom le permettait, avec par exemple Vg-1, BMP-4, et TGF- β .

ENCART 4B La voie de signalisation Wnt/β-caténine

La famille de protéines de signalisation intercellulaire Wnt (à prononcer « Wints »), dont le nom combine celui des protéines codées par le gène wingless de la drosophile et par le gène Int des mammifères (maintenant appelé Wint1), est responsable d'une voie de signalisation jouant un rôle important dans le développement. Chez toutes les espèces étudiées jusque-là, les protéines Wnt s'avèrent impliquées dans la spécification des destinées cellulaires dans de nombreuses situations du développement. Des fonctions concernant Wingless chez la drosophile ont déjà été évoquées et beaucoup plus de fonctions relevant de la famille Wnt seront rencontrées dans l'ensemble du livre. Chez les humains adultes, Wnt est requis pour que se maintienne le renouvellement des cellules souches, et un contrôle incorrect de sa voie de signalisation est impliqué

dans des cancers communs tel celui du colon.

Les protéines Wnt peuvent activer différentes voies de signalisation intracellulaire : l'une d'elles, illustrée ici, est impliquée dans la spécification des destinées cellulaires chez tous les animaux lors de leur développement précoce. La première à avoir été décrite, et depuis nommée voie canonique Wnt/β-caté**nine**, aboutit à une accumulation de la protéine β -caténine qui agit comme co-activateur transcriptionnel. (la β-caténine peut aussi intervenir en tant qu'élément liant les molécules d'adhérence cellulaire au cytosquelette (voir Encart 9A), fonction distincte de son rôle de co-activateur transcriptionnel). D'autres voies Wnt seront décrites dans l'ouvrage. Une version simplifiée de la voie canonique Wnt/ β -caténine est montrée Figure 1. Comme pour beaucoup de voies de signalisation du développement, le signal Wnt initial est converti, ou « transduit », dans le noyau, en un changement de l'expression génique. Ici, le signal Wnt empêche la β-caténine d'être dégradée dans le cytoplasme, rendant possible son accumulation et son entrée dans le noyau où elle se fixe, en les activant, sur les facteurs de transcription de la famille TCF (pour T-Cell specific Factor), ce qui permet ainsi l'expression de certains gènes cibles.

En l'absence du signal Wnt, la β -caténine est liée dans le cytoplasme à un complexe protéique de dégradation (partie gauche de la Figure 1). Celui-ci comporte des protéines kinases, CK1 γ et GSK-3 β , qui en phosphorylant la β -caténine, la destine à



Figure 1

être ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. En l'absence de β-caténine dans le noyau, des co-represseurs transcriptionnels se lient aux facteurs de transcription TCF et empêchent l'expression génique.

Comme la plupart des signaux extracellulaires, Wnt agit sur ses cellules cibles en se liant à une protéine réceptrice transmembranaire Frizzled présente à la surface cellulaire (partie droite de la Figure 1). Le signal provoqué par la fixation de Wnt traverse la membrane par l'intermédiaire de Frizzled auquel est associé un co-récepteur LRP, Wnt lui-même ne pénétrant pas dans la cellule. L'activation de ces récepteurs fait que les mêmes protéines kinases qui phosphorylent la β-caténine dans le complexe de dégradation s'associent alors à la membrane et phosphorylent la queue cytoplasmique de LRP. La phosphorylation, en modifiant l'activité des protéines ou leurs interactions avec d'autres protéines, est une caractéristique ubiquitaire dans les voies de signalisation qui permet la poursuite de la transmission d'un signal. Un recrutement s'effectue au niveau membranaire de la protéine de signalisation intracellulaire Dishevelled (Dsh) et de la protéine Axine du complexe de dégradation, sur les queues de LRP et de Frizzled, ce qui empêche la formation du complexe de dégradation et laisse la β-caténine libre de s'accumuler et de pénétrer dans le noyau. Dans ce dernier, la β-caténine en se liant à TCF déplace les co-represseurs, lève la répression et permet aux gènes cibles de s'exprimer.

L'axe animal-végétatif de l'œuf est lié à l'axe antéro-postérieur du têtard, car la tête se formera à partir de la région animale, mais les axes du têtard et de l'ovule fécondé ne sont pas directement comparables (voir Fig. 4.1). Le côté de la région animale qui formera la tête n'est pas déterminé jusqu'à ce que le côté dorsal de l'embryon soit spécifié, ce qui ne se produit qu'après la fécondation. La position précise de l'axe antéro-postérieur de l'embryon dépend donc de la spécification de l'axe dorso-ventral.

4.2 L'activation locale de la signalisation Wnt/β-caténine spécifie le futur côté dorsal de l'embryon

L'ovule sphérique non fécondé du xénope possède une symétrie radiaire autour de l'axe animal-végétatif, et cette symétrie n'est rompue que lorsque l'ovule est fécondé. L'entrée du spermatozoïde initie une série d'événements qui définissent l'axe dorso-ventral de la gastrula (voir la Section 3.1 pour un aperçu général du développement du xénope), la face dorsale étant plus ou moins opposée au point d'entrée du spermatozoïde.

L'entrée du spermatozoïde, qui peut se produire n'importe où dans l'hémisphère animal de l'ovule permet à la couche externe du cytoplasme, le cortex, de se désolidariser du cytoplasme dense profond et de bouger indépendamment de celui-ci. Le cytoplasme cortical est un gel riche en filaments d'actine et en molécules associées. Pendant le premier cycle cellulaire, celui-ci effectue une rotation d'environ 30° par rapport au cytoplasme profond et en direction du site d'entrée du spermatozoïde (Fig. 4.3). Suite à cette **rotation corticale**, un réseau de microtubules souscorticaux se repositionne, plaçant les extrémités « plus » à l'opposé du site d'entrée du spermatozoïde.

Les microtubules servent de rails pour le transport de certaines protéines maternelles et d'ARNm, et leur déplacement depuis le pôle végétatif vers des sites situés au niveau équatorial et à l'opposé du point d'entrée du spermatozoïde crée une asymétrie dans le zygote. Ces facteurs délocalisés spécifient le futur côté dorsal de l'embryon, générant un deuxième axe de symétrie : l'axe dorso-ventral (voir Fig. 4.3). Les cellules qui héritent de ces facteurs forment des structures dorsales, et pour cette raison, ils sont souvent appelés facteurs dorsalisant. En raison du fait que le plan de la première division passe généralement par le site d'entrée du spermatozoïde et divise l'embryon en moitiés droite et gauche, les deux blastomères héritent de certains facteurs de dorsalisation. Ceci explique pourquoi, lorsqu'ils sont séparés, chacun d'eux peut donner naissance à un embryon quasi-parfait, comme cela a été décrit au Chapitre 1. La seconde division de clivage est orthogonale à la première et se traduit donc par deux blastomères « dorsaux » contenant des facteurs dorsalisant et deux « ventraux » qui n'en contiennent pas. Lorsque l'embryon est coupé en deux à ce stade, de sorte qu'une moitié comprend les deux blastomères dorsaux et l'autre les deux blastomères ventraux, les blastomères dorsaux développent la plupart des structures de l'embryon, à l'exception de l'intestin. En revanche, les blastomères ventraux donnent naissance à des embryons avec une symétrie radiaire dépourvue de structures dorsales et antérieures (Fig. 4.4). Cette expérience démontre que les régions dorsale et ventrale sont LES + EN

Animation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine

Fig. 4.3 Le futur côté dorsal de l'embryon d'amphibien apparaît du côté opposé à celui du point d'entrée du spermatozoïde suite à la redistribution de facteurs dorsalisant maternels lors de la rotation corticale. Après la fécondation (schéma de gauche), la couche corticale située juste en dessous de la membrane cellulaire effectue une rotation de 30° en direction de la future région dorsale. Il s'ensuit que les facteurs dorsalisant de la voie Wnt, tels que les ARNm *wnt11* et la protéine Dishevelled (Dsh) figurés par des points verts, se trouvent déplacés depuis leur site initial au pôle végétatif vers un lieu approximativement opposé à celui du point d'entrée du spermatozoïde (schéma central gauche). Ces facteurs sont éloignés du pôle végétatif en étant transportés le long de microtubules présents à l'interface entre le cortex et la masse cytoplasmique vitelline. La voie Wnt est activée dans les cellules chez lesquelles ont été transmis ces facteurs au cours du clivage (schéma central droit, les points rouges indiquent l'activation de la voie de signalisation Wnt) et provoque une concentration nucléaire de β-caténine dans le futur côté dorsal de la blastula (non montré ici). Chez la blastula âgée (schéma de droite), l'organisateur de Spemann est mis en place dans la région dorsale et se situe où la gastrulation débutera. V, ventre ; D, dos.





Fig. 4.4 Des déterminants dorsaux sont essentiels pour un développement normal. Si un embryon de xénope est séparé en

si un embryon de xenope est separe en ses moitiés ventrales et dorsales au stade quatre cellules, la moitié dorsale contenant les déterminants dorsaux se développe en un embryon dorsalisé dépourvu de tube digestif (à comparer avec l'embryon normal), cependant que la moitié ventrale, qui ne possède pas de déterminants dorsaux, est ventralisée et ne comporte pas de structures dorsale et antérieure.

spécifiées dès le stade quatre cellules. Les embryons ventralisés se développant à partir des deux blastomères ventraux sont similaires à ceux obtenus après ablation de l'hémisphère végétatif de l'ovule tout juste fécondé, avant que ne se produise la relocalisation des facteurs dorsalisant suite à la rotation corticale.

L'établissement de l'axe dorso-ventral est un événement clé du développement du xénope, car il établit les conditions nécessaires à la formation du centre organisateur embryonnaire, le centre organisateur de Spemann, qui se trouve au niveau de la lèvre dorsale du blastopore de la gastrula. Comme il a été vu au Chapitre 1, ce centre organisateur a initialement été découvert en remarquant que la greffe de la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon de triton dans le blastocœle d'un autre embryon de triton pouvait induire la formation d'un deuxième axe embryonnaire. Lorsque la lèvre dorsale du blastopore d'une gastrula précoce de xénope est greffée à un site opposé d'une autre gastrula précoce de xénope, un embryon jumeau se développe aussi. Un deuxième axe du corps principal est induit, ayant sa propre tête à l'avant et un axe dorso-ventral complet (Fig. 4.5).

L'importance de la rotation corticale pour l'établissement de l'axe dorso-ventral a été démontrée par des expériences dans lesquelles la rotation était bloquée. La rotation corticale peut être inhibée en irradiant le côté ventral de l'œuf avec de la lumière ultraviolette (UV), ce qui perturbe les microtubules responsables du transport des facteurs de dorsalisation. Les embryons issus de ces œufs sont ventralisés. Ils sont en effet privés de structures normalement formées du côté dorsal. Ils développent par contre des quantités excessives d'un type de mésoderme à l'origine du sang, un tissu qui, normalement, est seulement présent au niveau de la ligne médiane ventrale de l'embryon. Avec des doses très élevées de rayonnement, les structures dorsales mais aussi antérieures sont absentes et l'embryon ventralisé s'apparente à un petit cylindre déformé (voir Fig. 4.4). Les effets délétères de l'irradiation UV peuvent toutefois être récupérés en renversant l'œuf. En raison de la gravité, le vitellus dense glisse contre le cortex, ce qui permet de restaurer efficacement la rotation et la localisation des facteurs maternels.

Les facteurs maternels de dorsalisation comprennent les ARNm *wnt11* et *wnt5a*, et la protéine Dishevelled, constituants de la voie de signalisation Wnt. Suite à leur synthèse, les protéines Wnt-11 et Wnt-5a forment un complexe qui active la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules dorsales. Pour étudier le rôle de la signalisation Wnt dans la dorsalisation, la production d'un des récepteurs Wnt, Fz7 (Frizzled 7), a été inhibée dans l'embryon en utilisant des oligonucléotides morpholino antisens (voir Encart 6B). En l'absence du récepteur, la voie Wnt/ β -caténine ne peut pas être activée par un signal Wnt extracellulaire. Les structures dorsales ne se développent pas, démontrant que la signalisation Wnt est nécessaire à la dorsalisation.

La voie Wnt/ β -caténine (voir Encart 4B) est l'une des nombreuses voies de signalisation qui peuvent être stimulées par les protéines Wnt, comme cela a été déjà observé chez la drosophile en réponse à Wingless. Lorsque la voie est inactive, le co-activateur de transcription β -caténine est lié à un complexe protéique de dégradation où il est phosphorylé par la protéine kinase GSK-3 β . La phosphorylation de la β -caténine entraîne sa dégradation par le protéasome. En revanche, lorsque la voie de signalisation est activée, la β -caténine est stabilisée, entre dans le noyau et contribue à réguler l'expression des gènes.

La β -caténine maternelle est initialement présente dans toute la région végétative mais sa dégradation n'est empêchée que du futur côté dorsal de l'embryon suite à l'activation de la voie canonique de signalisation Wnt par les facteurs de dorsalisation. Au stade deux cellules, la β -caténine a commencé à s'accumuler dans un côté du cytoplasme des deux cellules. Au cours des deuxième et troisième clivages, elle rentre dans les noyaux des cellules dorsales d'où elle favorisera plus tard l'activation de gènes zygotiques nécessaires aux étapes ultérieures du développement.

Le rôle crucial de l'activation de la voie de signalisation de Wnt dans la spécification des cellules dorsales est démontré par des expériences dans lesquelles l'ARNm β -caténine a été injecté dans une cellule végétative ventrale d'un embryon de xénope au stade 32 cellules. Ces injections ont abouti à la formation d'embryons jumelés en raison de la dorsalisation des cellules ventrales. Celle-ci entraîne une série d'événements aboutissant à la formation d'un second centre organisateur (Fig. 4.6)

La signalisation Wnt est également limitée à la région dorsale de la blastula par l'antagoniste de la signalisation Wnt d'origine maternelle Dickkopf1 (Dkk1) présent dans la région ventrale. Dkk1 est une protéine sécrétée qui, en se liant au co-récepteur Wnt LRP6 (voir Encart 4B), bloque la fonction de celui-ci et inhibe l'activation de la voie. Comme il sera vu tout au long de ce chapitre, l'inhibition de l'activité des protéines de signalisation sécrétées est une stratégie importante dans le développement pour restreindre la signalisation à des régions spécifiques. La voie Wnt pourrait également être activée directement dans les cellules dorsales via ses composants tels que la protéine Dishevelled, qui est déplacée dans la future région dorsale à la suite de la rotation corticale (voir Fig. 4.3). Dishevelled empêche la formation du complexe contenant l'enzyme GSK-3β nécessaire pour la dégradation de la β-caténine (voir Encart 4B). Le rôle clé joué par l'inhibition de l'activité de la GSK-3β dans l'établissement de la future région dorsale explique pourquoi des expériences anciennes montraient que le traitement des embryons précoces de xénope par le chlorure de lithium les dorsalisait. Le lithium est connu pour bloquer l'activité de GSK-3β, et son utilisation favorise la formation de structures dorsales et antérieures au détriment des structures ventrales et postérieures.

4.3 Des centres de signalisation se développent du côté dorsal de la blastula

Le centre organisateur de Spemann est induit par des signaux provenant d'un autre centre de signalisation situé dans la région dorsale de la blastula précoce. Les actions combinées de Wnt-11, Wnt-5a, β -caténine et d'autres facteurs maternels présents du côté dorsal de la région végétative conduisent à la formation d'un centre de signalisation connu sous le nom d'**organisateur de la blastula** ou **centre de Nieuwkoop** (Fig. 4.7). Ce centre a reçu le nom de l'embryologiste néerlandais Pieter Nieuwkoop, qui a découvert les propriétés dorsalisantes et inductrices du mésoderme de cette région végétative grâce à des expériences consistant à combiner des explants de tissu de la calotte animale de blastulas avec des explants végétatifs. Avant ces expériences, à la fin des années 1960, on pensait que le mésoderme (à partir duquel certaines structures dorsales clés telles que la corde se forment) était intrinsèquement spécifié en une région cytoplasmique particulière de l'œuf d'amphibien, tout comme l'endoderme et l'ectoderme. Ces expériences de combinaison suggérèrent plutôt que le mésoderme était induit à partir de l'ectoderme présomptif par une signalisation de l'endoderme présomptif, comme cela sera décrit plus loin dans le chapitre.

Le centre de Nieuwkoop apparaît au début du stade blastula et établit la polarité dorso-ventrale initiale. Le centre de Spemann est alors induit juste au-dessus du centre de Nieuwkoop dans la région équatoriale de la gastrula précoce. L'activité de signalisation du centre de Nieuwkoop peut être démontrée en greffant les cellules de la région dorso-végétative d'un embryon de xénope au stade 32 cellules dans la région ventrale d'un autre embryon. Il en résulte un embryon jumelé à deux faces dorsales (Fig. 4.8). Les cellules du greffon contribuent elles-mêmes aux tissus endodermiques, mais pas aux tissus mésodermiques et neuraux du nouvel axe.





Fig. 4.5 La greffe de l'organisateur de Spemann peut induire un nouvel axe corporel chez le xénope. Quand l'organisateur de Spemann issu d'une gastrula de xénope est greffé dans la région ventrale d'une autre gastrula, un embryon jumeau se forme en partie, le second axe corporel ayant été induit par l'organisateur greffé. Ce nouvel axe possède un axe dorso-ventral complet et une tête individualisée. L'organisateur produit donc des signaux qui non seulement organisent le mésoderme dorso-ventral, mais aussi induit le tissu nerveux et les structures antérieures. Barre d'échelle = 1 mm.

Photographie aimablement communiquée par J. Smith.



Fig. 4.6 Induction d'une seconde région dorsale par l'injection d'ARNm de β -caténine. L'injection d'un ARNm codant la β -caténine dans des cellules végétatives ventrales active la signalisation Wnt et spécifie un nouvel organisateur au niveau du site d'injection, ce qui conduit à la formation d'embryons siamois.

Cela montre que les cellules greffées agissent comme un centre de signalisation et sont capables d'induire ces destinées mésodermique et neurale dans les cellules de l'embryon hôte. En revanche, la greffe de cellules ventrales du côté dorsal n'a aucun effet.

Bien que la β-caténine progressivement localisée dans les noyaux des deux régions animales et végétatives devienne responsable de la spécification dorsale (voir Fig. 4.7), le centre de Nieuwkoop apparaît lui dans la région végétative. Sa spécification dépend en effet non seulement de la β -caténine nucléaire, mais aussi du facteur de transcription maternel VegT, présent dans toute la région végétative depuis la fécondation. Dans la blastula, la β-caténine nucléaire des cellules végétatives produisant également VegT favorise l'activation des gènes zygotiques tels que siamois, qui code un facteur de transcription définissant le centre de Nieuwkoop et participant aussi à l'induction du centre organisateur de Spemann. VegT est également nécessaire pour induire l'expression des gènes codant les protéines apparentées à Nodal, des protéines de signalisation sécrétées qui induisent l'organisateur de Spemann dans la région équatoriale ainsi que le mésoderme (voir Encart 4A). Les protéines apparentées à Nodal sont des homologues de la protéine Nodal de la souris, et les membres de cette famille Nodal sont des facteurs clés dans l'induction mésodermique chez tous les vertébrés. Ces protéines appartiennent à une famille plus large encore, celle des protéines de signalisation du TGF- β qui sera évoquée plus loin dans ce chapitre, à propos de l'induction et la structuration du mésoderme.

RÉSUMÉ

Chez l'embryon d'amphibien, les facteurs maternels déterminent l'axe animal-végétatif, qui correspond approximativement au futur axe antéro-postérieur. L'axe dorso-ventral est spécifié par le site d'entrée du spermatozoïde et la rotation corticale résultant de cette entrée. Cette rotation relocalise un ensemble de facteurs maternels « dorsalisant » vers un nouvel emplacement, qui est ainsi défini comme le côté dorsal. Ces facteurs maternels comprennent des éléments de la voie de signalisation Wnt et le facteur de transcription VegT. Leurs actions conduisent à l'établissement d'un centre de signalisation local, le centre de Nieuwkoop, sur le côté dorsal de la blastula qui, greffé, peut diriger le développement d'un embryon jumelé. Le centre de Nieuwkoop induit la formation du centre organisateur de Spemann au-dessus de lui dans la région équatoriale dorsale de la gastrula précoce, comme cela sera considéré dans la prochaine partie du chapitre, à propos de l'induction du mésoderme.

Origine et spécification des feuillets embryonnaires

Il a été vu dans les sections précédentes comment l'axe animal-végétatif de l'œuf de xénope est déterminé par la mère et comment l'axe dorso-ventral est établi par une série d'événements déclenchés par l'entrée de spermatozoïde. Ce sont les premiers signes d'organisation tissulaire de l'embryon de xénope en rapport avec ces deux axes qui sont ici abordés avec la spécification des trois feuillets embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, et la façon dont ceux-ci sont eux-mêmes organisés en différentes régions donnant naissance à des structures distinctes (voir Encart 1C).

Tous les tissus du corps sont dérivés de ces trois feuillets embryonnaires initiaux. L'ectoderme est organisé de telle sorte que sa région dorsale donne naissance au système nerveux et le reste à l'épiderme de la peau. Le mésoderme est ordonné en différentes régions le long de l'axe dorso-ventral donnant naissance, entre autres, à la chorde, les muscles, le cœur, les reins et les tissus sanguins. L'endoderme est à l'origine du tube digestif, et de différentes régions de celui-ci sont issus des organes associés tels que les poumons, le foie et le pancréas. La carte des territoires présomptifs de l'embryon précoce de xénope sera tout d'abord examinée, celle-ci indiquant quels tissus seront générés à partir de régions particulières de l'embryon. Il sera ensuite considéré comment les trois feuillets primordiaux sont spécifiés puis structurés. La structuration du mésoderme et de l'ectoderme est bien comprise et de nombreux gènes et protéines impliqués ont été identifiés.

4.4 La carte des territoires présomptifs de la blastula de xénope rend compte du rôle de la gastrulation

La carte des territoires présomptifs d'une blastula âgée de xénope (Fig. 4.9) montre que la région végétative la plus chargée en vitellus, qui occupe le tiers inférieur de la blastula de forme sphérique, donne naissance à la plus grande partie de l'endoderme. Le vitellus qui est présent dans toutes les cellules, fournit les nutriments nécessaires au développement de l'embryon, et est progressivement utilisé au fur et à mesure de sa progression. À l'opposé, l'hémisphère animal forme l'ectoderme. Le futur mésoderme est présent sous la forme d'une bande, la zone marginale, au niveau de la région équatoriale de la blastula, Chez le xénope, mais pas chez tous les amphibiens, une fine couche externe d'endoderme présomptif recouvre le mésoderme présomptif de la zone marginale.

La carte des territoires présomptifs de la blastula éclaire la fonction de la gastrulation. Au stade blastula, le futur endoderme, à l'origine du tube digestif, est encore à l'extérieur et doit donc être intériorisé. De même, le futur mésoderme, qui formera des tissus et des organes internes, doit pénétrer à l'intérieur. Pendant la gastrulation, la zone marginale se déplace vers l'intérieur en passant par la lèvre dorsale du blastopore correspondant au site de l'organisateur de Spemann, mis en place au-dessus du centre de Nieuwkoop. La carte du futur mésoderme (voir Fig. 4.9) montre que différentes régions le long de l'axe dorso-ventral de la blastula ont des destins différents. Le mésoderme le plus dorsal donne naissance à la chorde et le mésoderme adjacent se développe en somites à l'origine de muscles et de quelques tissus squelettiques. Puis plus ventralement se trouve le mésoderme des lames latérales contenant le mésoderme cardiaque et rénal, et les îlots sanguins à partir desquels se forme initialement le tissu sanguin (l'hématopoïèse) dans l'embryon. Il existe également d'importantes différences entre l'ectoderme dorsal et ventral de l'hémisphère animal. Le côté ventral de l'hémisphère animal donnera naissance à l'épiderme et le côté dorsal au système nerveux. Après la formation du tube neural, l'épiderme s'étalera sur l'ensemble de l'embryon.

Les termes « dorsal » et « ventral » sur la carte des territoires présomptifs peuvent paraître parfois un peu déroutants parce que l'orientation de la carte ne correspond pas toujours exactement aux points cardinaux fixés par les axes. En raison des mouvements cellulaires pendant la gastrulation, les cellules du côté dorsal de la blastula donnent naissance à des structures antérieures de l'embryon, comme la tête, en plus des structures dorsales. Ceci explique pourquoi les embryons dorsalisés décrits dans la Section 4.2 ont des structures antérieures bien développées. Les cellules du côté ventral de la blastula donnent non seulement naissance à des structures ventrales mais formeront aussi l'extrémité postérieure de l'embryon.





Fig. 4.7 Mise en place du centre de Nieuwkoop. Chez le xénope, la rotation

corticale déplace les déterminants dorsaux (en vert) vers le futur côté dorsal de l'embryon, créant une large région où la β -caténine migre dans les noyaux depuis le cytoplasme (en rouge). Les cellules de la région de la blastula dans lesquelles la β -caténine est intranucléaire, et où VegT est également présent, produisent le facteur de transcription Siamois (coloration bleue). Le centre de Nieuwkoop se développe dans la région dorso-végétative de la jeune blastula.

Fig. 4.8 Le centre de Nieuwkoop peut spécifier une nouvelle région dorsale. Quand les cellules dorso-végétatives constituant le centre de Nieuwkoop d'une blastula de xénope au stade 32 cellules sont greffées dans la région ventrale d'une autre blastula, un second axe corporel se forme et des embryons siamois se développent. Les cellules greffées émettent des signaux et contribuent au développement de tissus endodermiques mais non au mésoderme et aux tissus neuraux du second axe.





Fig. 4.9 Carte des territoires présomptifs d'une blastula âgée de xénope.

L'ectoderme (colorations bleues) donne naissance à l'épiderme et au système nerveux. En suivant l'axe dorso-ventral, le mésoderme (rouge et jaune orangé) est à l'origine de la chorde, des somites, du cœur, des reins et des éléments sanguins. À noter que ces derniers peuvent également se former dans des régions plus dorsales. L'endoderme (en jaune) donne le tube digestif. Chez le xénope, mais non chez tous les amphibiens, il existe aussi de l'endoderme (non montré ici) qui recouvre le mésoderme dans la zone marginale.

4.5 L'absence de détermination des cellules de l'embryon précoce de xénope rend possible une régulation

Les embryons précoces de vertébrés ont des pouvoirs de régulation considérables lorsque des parties de l'embryon sont enlevées ou réarrangées (voir Section 1.3). Des fragments d'un zygote de xénope ne représentant que le quart du volume normal peuvent se développer en petits embryons plus ou moins bien proportionnés. De même, et comme évoqué plus haut, chaque blastomère du stade deux cellules peut se développer en un embryon normal. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme organisateur impliquant des interactions cellule-cellule capables de compenser de telles différences de taille initiales. Il existe cependant des limites à cette capacité de régulation. Ainsi les moitiés dorsales des embryons au stade quatre cellules peuvent produire par régulation, contrairement aux moitiés ventrales, des embryons à peu près normaux mis à part l'absence de tube digestif. Comme il a été vu dans la Section 4.3, les centres de signalisation essentiels se développent dorsalement et c'est pourquoi les moitiés ventrales en l'absence de tels centres, forment des embryons à symétrie radiaire.

De manière remarquable, la régulation peut même se produire à partir d'une blastula âgée de xénope coupée en deux, à condition que chaque moitié contienne une partie du centre organisateur de Spemann (Fig. 4.10). Cette expérience montre qu'au stade blastula, de nombreuses cellules ne sont pas encore spécifiées ou déterminées (voir Section 1.12 et Fig. 1.22) et cela peut également être vrai pour des stades ultérieurs. Cela signifie que le potentiel de développement des cellules à ces stades assez tardifs est plus important que leur position sur la carte des territoires présomptifs ne le suggère.

L'état de détermination des cellules d'un embryon peut être étudié en les transplantant dans une région différente d'un embryon hôte et en observant leur développement. Si elles sont déjà déterminées, elles se développeront en accord avec leur position initiale. Si elles ne sont pas encore, elles se développeront selon leur nouvelle position. Dans une série d'expériences, on a introduit dans le blastocœle de gastrulas des cellules de blastulas et de gastrulas de xénope préalablement dissociées et marquées, et observé le devenir de leurs cellules filles pendant la gastrulation. En général, les cellules transplantées issues de jeunes blastulas ne sont pas encore déterminées, leur descendance se différenciant en fonction des signaux qu'elles reçoivent à leur nouvel emplacement. Ainsi, la descendance de cellules végétatives, donnant normalement de l'endoderme, peut contribuer à la formation d'une large gamme d'autres tissus tels que les muscles ou le système nerveux. De même, la descendance de cellules animales issues d'une jeune blastula, dont le devenir normal est l'épiderme ou le tissu nerveux, peut former de l'endoderme ou du mésoderme. Avec le temps, les cellules deviennent graduellement déterminées, de sorte que des cellules issues de blastulas plus âgées et de jeunes gastrulas se développeront selon leur destinée établie au moment de la transplantation.

4.6 L'endoderme et l'ectoderme sont spécifiés par des facteurs maternels, tandis que le mésoderme est induit à partir de l'ectoderme par des signaux provenant de la région végétative

Lorsque des explants provenant de différentes régions d'une jeune blastula de xénope sont cultivés dans un milieu neutre contenant les sels nécessaires à l'équilibre ionique, ceux de la région située près du pôle animal, habituellement appelée calotte animale, formeront une boule de cellules épidermiques. Les explants de la région végétative formeront eux, de l'endoderme (Fig. 4.11). Ces résultats sont conformes avec le devenir normal de ces régions. Il est donc généralement admis que chez le xénope, tout l'ectoderme et la plus grande partie de l'endoderme sont spécifiés par des facteurs maternels présents dans l'œuf. Rien n'indique que des signaux d'autres régions de l'embryon soient nécessaires pour leur spécification initiale.

Un déterminant maternel potentiel de l'ectoderme, localisé au pôle animal du zygote, est l'ARNm d'une ubiquitine-ligase E3, l'Ectodermine. Cet ARNm est transmis aux cellules se développant à partir de la région animale et la protéine Ectodermine se retrouve dans les noyaux des cellules formant la calotte l'animale (Fig. 4.12).

Fig. 4.10 Chaque moitié d'une blastula de xénope sectionnée en deux peut donner un têtard complet. La division en deux d'une blastula de xénope est illustrée dans le schéma du haut. La formation de deux jumeaux identiques à partir de chacune des moitiés (photographie du bas) montre qu'une régulation peut se produire à un stade avancé du développement. Les jumeaux ne peuvent uniquement se développer que si chaque moitié comporte une partie du centre de Spemann. Un embryon normal est montré au-dessus à titre de comparaison.

Reproduit avec l'autorisation de De Robertis, E.M. **Spemann's organizer and self-regulation in** *amphibian embryos*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2006, **7** : 296-302.

L'Ectodermine ajoute l'ubiquitine à Smad4, une protéine régulatrice impliquée à la fois dans la signalisation BMP et la signalisation TGF- β de type nodal (Encart 4C), ce qui entraîne sa dégradation et réduit ainsi l'activité de ces deux voies de signalisation. Celles-ci sont impliquées dans l'induction et la différenciation du mésoderme ainsi que dans la spécification neurale. La principale fonction de l'Ectodermine est de limiter la formation de mésoderme à la zone marginale. Un autre déterminant plus tardif de l'ectoderme est le facteur de transcription zygotique Fox11e, qui est produit dans les cellules de l'hémisphère animal de la blastula âgée. Fox11e est nécessaire au maintien de l'identité régionale de ces cellules et à leur différenciation ectodermique (voir Fig. 4.12). En l'absence de Fox11e, les cellules animales se mélangent avec des cellules des autres feuillets embryonnaires et se différencient selon leurs nouvelles positions.

Un déterminant maternel-clé de l'endoderme est l'ARNm du facteur de transcription VegT. Il est situé dans la région végétative du zygote et est transmis aux cellules qui se développent dans cette région. L'injection d'ARNm *vegt* dans des cellules de la calotte animale induit l'expression de marqueurs spécifiques de l'endoderme, tandis que le blocage de la traduction de l'ARNm *vegt* dans la région végétative, suite à l'injection d'oligonucléotides antisens de cet ARNm (voir Encart 6B), entraîne la disparition d'endoderme. Dans les embryons appauvris en VegT, on ne trouve que de l'ectoderme. VegT est donc aussi essentiel pour la production de signaux impliqués dans la formation de mésoderme (voir *infra*).

Contrairement à l'ectoderme et à l'endoderme, le mésoderme n'est pas spécifié par des déterminants maternels présents dans l'œuf. Ce sont des signaux produits par l'endoderme présomptif qui l'induisent au niveau d'une bande équatoriale d'ectoderme présomptif de la blastula. La présence de mésoderme dans une blastula âgée peut être démontrée en cultivant des explants prélevés dans la zone marginale là où cellules animales et végétatives sont voisines. Lorsque ces explants sont cultivés, ils ne forment pas seulement des dérivés ectodermiques mais aussi du mésoderme (Fig. 4.13, schémas du haut). Le mésoderme peut être distingué histologiquement car, après quelques jours de culture, peuvent se former du muscle, de la chorde, du sang et du mésenchyme (tissu conjonctif lâche). Il peut également être identifié par des protéines spécifiquement produites par les cellules mésodermiques, telles que l'actine musculaire.

L'induction du mésoderme suite aux interactions entre les cellules animales et végétatives dans la blastula précoce a pu être démontrée par une expérience décisive de







Fig. 4.11 Devenir d'explants constitués de cellules animales et végétatives issues d'une jeune blastula de xénope. Des cellules de la coiffe animale (en bleu, 1) isolées forment d'eux-mêmes de l'épiderme cependant que des cellules végétatives isolées (en jaune, 2) donnent de l'endoderme.





co-culture de la calotte animale placée en contact avec les cellules végétatives de la région près du pôle végétatif (Fig. 4.13, schémas du bas). Dans ces conditions, des tissus mésodermiques se forment au sein des explants. Ce modèle de culture d'explants est devenu standard pour étudier l'induction mésodermique. La confirmation que le mésoderme est formé à partir des cellules de la calotte animale et non des cellules végétatives a été obtenue en pré-marquant la région animale de la blastula avec un marqueur de lignée cellulaire et en montrant que les cellules marquées forment le mésoderme. De toute évidence, la région végétative produit un signal ou des signaux pouvant induire le mésoderme.

En effet, si les explants animaux et végétatifs sont séparés par un filtre dont les pores sont trop petits pour permettre la formation de contacts cellule-cellule, l'induction mésodermique a toujours lieu. Ceci suggère que les signaux inducteurs de mésoderme sont sous la forme de molécules sécrétées qui diffusent à travers l'espace extracellulaire et ne passent pas directement d'une cellule à l'autre *via* des jonctions cellulaires (voir Fig. 1.25).



Fig. 4.13 Induction du mésoderme par la région végétative de la blastula de xénope.

En haut : des explants de cellules de la coiffe animale (en bleu, 1) ou de cellules végétatives (en jaune, 4) provenant d'une blastula âgée, forment de manière autonome uniquement de l'ectoderme et de l'endoderme, respectivement. Des explants issus de la région équatoriale (2 et 3) où se côtoient les régions animales et végétatives forment à la fois des tissus ectodermiques (épiderme et tube neural, en bleu) et mésodermiques (mésenchyme, cellules sanguines, chorde et muscles, en rouge), indiquant que l'induction du mésoderme a eu lieu. La raison des différences de nature des tissus mésodermiques formés par les explants dorsaux et ventraux est expliquée plus loin dans ce chapitre. En bas : l'expérience standard pour étudier l'induction du mésoderme est de prendre des explants cellulaires issus de la coiffe apicale et de la région végétative qui sont normalement et respectivement à l'origine d'ectoderme et d'endoderme, et de les cultiver ensemble durant 3 jours. Quand de tels explants sont prélevés à partir d'une jeune blastula chez laquelle le mésoderme n'a pas encore été spécifié, puis sont combinés et cultivés, des tissus mésodermiques incluant chorde, éléments musculaires et sanguins, et du tissu conjonctif lâche (en rouge) se développent à partir des cellules de la coiffe animale.

ENCART 4C Voie de signalisation de membres de la famille des facteurs de croissance TGF- β

La signalisation par des membres de la famille TGF- β passe par différentes combinaisons de sous-unités réceptrices et des protéines régulatrices transcriptionnelles pour activer différents ensembles de gènes cibles. Les membres de cette famille impliqués dans le développement précoce des vertébrés tel que Nodal et les protéines qui lui sont apparentées, les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et l'activine, constituent des ligands dimériques agissant sur des récepteurs membranaires. Ceux-ci sont des hétérodimères formés de deux sous-unités, type I et type II, possédant des domaines intracellulaires sérine/thréonine kinase. Plusieurs formes différentes de sous-unités de Type I et II existent et leur association génère des récepteurs distincts pour les divers membres de la famille des TGF- β . La fixation du ligand a pour conséquence que la sous-unité II phosphoryle la sous-unité I, celle-ci phosphorylant à son tour des protéines intracellulaires de signalisation appelées Smads (Figure 1). Celles-ci doivent leur nom aux protéines Sma et Mad de la drosophile chez laquelle elles ont été découvertes. Les Smads phosphorylées se lient avec une protéine Smad d'un autre type, parfois appelée co-Smads, et forment un complexe de régulation transcriptionnel qui entre dans le noyau pour activer ou réprimer des gènes cibles. À des récepteurs différents correspondent des Smads différents, menant ainsi à l'activation de gènes cibles distincts, l'identité de la sous-unité de type I déterminant quels Smads sont activés. La réponse biologique dépend de la combinaison des gènes cibles activés et de l'environnement cellulaire.



Animation de la voie de signalisation TGF-β



Figure 1

La différenciation d'un tissu mésodermique tel que le muscle dans l'explant semble dépendre d'un **effet de communauté** des cellules induites. Des gènes spécifiques de muscle ne s'expriment pas si seules quelques cellules de la calotte animale sont placées sur le tissu végétatif. Même lorsqu'un petit nombre de cellules de calotte dissociées sont placées entre deux groupes de cellules végétatives, l'induction ne se produit pas. En revanche, des agrégats plus gros de cellules de calotte animale réagissent en exprimant fortement des gènes spécifiques des muscles (Fig. 4.14).

4.7 L'induction du mésoderme survient au cours d'une période restreinte du stade blastula

L'induction du mésoderme est l'un des événements clés du développement des vertébrés, car le mésoderme est lui-même une source de signaux essentiels pour le développement ultérieur de l'embryon. Chez le xénope, l'induction mésodermique est en grande partie achevée avant que la gastrulation ne commence. Des expériences d'explants comme celles décrites ci-dessus ont montré qu'il existait au stade blastula une période d'environ 7 heures durant laquelle les cellules animales sont **compétentes**, c'est-à-dire capables de répondre à un signal inducteur de mésoderme, et cette compétence est perdue environ



Fig. 4.14 L'effet de communauté.

Une cellule isolée ou un petit nombre de cellules de la coiffe apicale en contact avec du tissu végétatif ne sont pas induits en cellules mésodermiques et ne commencent pas à exprimer des marqueurs mésodermiques tels que des protéines spécifiquement musculaires. Un minimum d'environ 200 cellules de la coiffe animale est nécessaire pour que l'induction d'une différenciation musculaire puisse s'exprimer.

Fig. 4.15 Le moment où les gènes musculaires s'expriment n'est pas associé à celui de l'induction mésodermique. Les cellules isolées de la coiffe apicale d'une jeune blastula de xénope sont seulement compétentes pour répondre à des signaux inducteurs du mésoderme pendant une durée de 7 heures, entre la 4^e et 11^e heure

après la fécondation. Pour que les gènes cibles puissent s'exprimer, une exposition à l'inducteur doit être d'au moins 2 heures durant cette période. Quel que soit le moment où l'induction se produit durant la période de compétence, l'activation des gènes musculaires se manifeste au même moment, 16 heures après la fécondation. 11 heures après la fécondation. Une exposition de 2 heures des cellules animales au signal inducteur est suffisante pour la formation de structures mésodermiques.

On pourrait s'attendre à ce que l'expression des gènes spécifiques du mésoderme, tels que ceux du muscle, commence dès que le mésoderme est induit, mais ce n'est pas le cas. Les expériences avec des explants ont montré que, quel que soit le moment où les cellules sont exposées à l'induction de 2 heures pendant la période de compétence, l'expression génique spécifique du muscle commence toujours environ 5 heures après la fin de la période compétente, ce qui correspond au stade embryonnaire de la mi-gastrula (Fig. 4.15). L'expression génique musculaire se manifeste dès 5 heures après l'induction, si l'induction se produit tardivement dans la période de compétence, ou même 9 heures après l'induction, si l'induction se produit au début de la période compétence. Ces résultats suggèrent qu'il existe un mécanisme de synchronisation chronologique indépendant par lequel les cellules surveillent le temps écoulé depuis la fécondation, puis, à condition qu'elles aient reçu le signal induisant le mésoderme, elles expriment des gènes spécifiques des muscles.

La période prolongée de compétence donne à l'embryon toute latitude pour le moment du déclenchement de l'induction mésodermique et signifie que le signal inducteur ne doit pas se produire nécessairement à un moment précis prédéfini. Compte tenu de cette latitude, un mécanisme de synchronisation chronologique indépendant pour l'expression génique mésodermique est un moyen de maintenir le développement ultérieur coordonné, quel que soit l'instant réel de l'induction mésodermique.

4.8 L'expression des gènes zygotiques débute à la transition blatuléenne

Le début de la transcription à partir des propres gènes de l'embryon, souvent appelés gènes zygotiques, semble être sous un contrôle temporel intrinsèque. L'ovule du xénope contient de grandes quantités d'ARNm maternels, qui ont été déposés pendant l'ovogenèse. Après la fécondation, le taux de synthèse protéique augmente de 1,5 fois, et un grand nombre de nouvelles protéines sont synthétisées à partir des ARNm maternels. Il existe, en fait, très peu de nouvelles synthèses d'ARNm jusqu'à ce que 12 cycles de divisions aient eu lieu et que l'embryon contienne 4 096 cellules. À ce stade, la transcription à partir de gènes zygotiques commence, les cycles cellulaires deviennent asynchrones, et divers autres changements se produisent. Ces événements sont collectivement désignés sous le nom de **transition blastuléenne**, bien qu'ils se produisent en fait dans la blastula âgée, juste avant que la gastrulation ne commence. Quelques gènes zygotiques sont exprimés plus tôt, notamment deux gènes codant des protéines apparentées à Nodal, qui sont exprimés dès le stade des 256 cellules.

Comment est déclenchée la transition blatuléenne ? La suppression de la segmentation mais pas de la synthèse de l'ADN ne modifie pas le moment de l'activation de la transcription, et donc ce phénomène n'est pas directement lié à la division cellulaire. Les interactions cellule-cellule ne sont pas non plus impliquées, car des blastomères dissociés subissent la transition en même temps que les embryons intacts. Le facteur clé dans le déclenchement de la transition blastuléenne semble être le rapport de l'ADN au cytoplasme, c'est-à-dire la quantité d'ADN présente par unité de masse de cytoplasme.

Ceci est démontré par les expériences conduisant à une augmentation artificielle de la quantité d'ADN en permettant à plus d'un spermatozoïde d'entrer dans l'ovule ou en injectant de l'ADN supplémentaire dans ce dernier. Dans les deux cas, l'activation


transcriptionnelle se produit prématurément, ce qui suggère qu'il pourrait y avoir une certaine quantité fixe d'un répresseur général de la transcription présent initialement dans le cytoplasme de l'ovule. À mesure que la segmentation se déroule, la quantité de cytoplasme n'augmente pas, contrairement à la quantité d'ADN. La quantité de répresseur par rapport à celle de l'ADN devient de plus en plus petite jusqu'à ce qu'elle soit insuffisante pour permettre au répresseur de se fixer sur tous les sites disponibles de l'ADN, ce qui conduit à une levée de la répression. La chronologie de la transition blastuléenne semble ainsi correspondre à un modèle d'horloge à sablier (Fig. 4.16). Dans un tel modèle, quelque chose doit s'accumuler, ici l'ADN, jusqu'à ce qu'un seuil soit atteint, ce seuil étant déterminé par la concentration initiale du facteur cytoplasmique, qui lui n'augmente pas.

4.9 Les signaux d'induction du mésoderme et du plan primaire d'organisation sont produits par la région végétative, le centre organisateur, et le mésoderme ventral

Des expériences de culture d'explants décrites ci-dessus, utilisées pour étudier l'induction mésodermique, ont permis d'établir que le mésoderme est induit par des signaux provenant de la région végétative. Mais comment le mésoderme s'organise-t-il le long de l'axe dorso-ventral ? La carte des territoires présomptifs de la blastula âgée de xénope montre une régionalisation du mésoderme le long de l'axe dorso-ventral donnant lieu à des structures différentes (voir Fig. 4.9). La région la plus dorsale, où le centre organisateur se formera, donne lieu à la chorde, la suivante aux somites (tissu embryonnaire qui produit les muscles squelettiques et le squelette du tronc) ; puis vient le mésoderme donnant naissance à des organes tels que le cœur et les reins, avec la région la plus ventrale à l'origine du sang (bien que des quantités importantes de sang se formeront également à partir d'un mésoderme plus dorsal).

Les informations de position nécessaires à l'organisation antéro-postérieure du mésoderme sont fournies par des signaux provenant d'autres régions de la blastula et de la jeune gastrula. Des expériences combinant différentes parties de la région végétative avec des explants de calottes animales ont suggéré qu'il existe dans la mise en place du patron mésodermique des différences le long de l'axe dorso-ventral dues à l'activité de la région végétative de la blastula (Fig. 4.17). Par exemple, le tissu végétatif dorsal contenant le centre de Nieuwkoop induit la chorde et les muscles à partir des cellules de la calotte animale, alors que le tissu végétatif ventral induit principalement du tissu sanguin et peu de muscles. Comme cela a été déjà mentionné, le centre organisateur de Spemann apparaît dans la région dorsale de la zone marginale au début de la gastrula (voir Section 4.3). Le centre organisateur produit également



Fig. 4.16 Un mécanisme temporel qui pourrait opérer lors du développement. Un mécanisme basé sur une analogie avec un sablier pourrait mesurer le temps jusqu'à la transition blastuléenne. La décroissance de concentration de certaines molécules, tel qu'un répresseur transcriptionnel, pourrait se manifester avec le temps, et la transition pourrait se produire quand le répresseur atteint une valeur seuil critique basse de concentration. Ceci serait équivalent à ce qui se passe avec le sable qui coule dans le compartiment inférieur du sablier. Chez l'embryon, une réduction de l'activité du répresseur par noyau se produirait en fait, car la concentration du répresseur dans l'embryon reste constante dans son ensemble, mais le nombre de noyaux augmente par suite des divisions cellulaires. La quantité de répresseur par noyau devient ainsi progressivement moindre au fil du temps.



Fig. 4.17 Différences de l'induction du mésoderme par les régions dorsale et végétative. La région dorsale végétative d'une blastula de xénope, qui contient le centre de Nieuwkoop, induit chez les cellules de la coiffe animale la chorde et du tissu musculaire, cependant que les cellules végétatives ventrales induisent chez ces mêmes cellules des éléments sanguins et les tissus qui leur sont associés. Fig. 4.18 Signaux impliqués dans l'induction du mésoderme et origine de sa régionalisation. Les signaux en provenance de la région végétative induisent initialement du mésoderme à partir de l'ectoderme de la zone animale, avec la région de l'organisateur spécifiée du côté le plus dorsal, là où le signal inducteur est le plus intense et le plus long en durée. Les signaux du côté ventral de l'embryon donnent un profil ventral au mésoderme, et l'extension de leur influence est limitée par les signaux émanant de la région de l'organisateur de Spemann (O) qui la contrecarre.



des signaux organisant le mésoderme. Cela a été démontré par des expériences de co-culture d'un fragment de la zone marginale dorsale de blastula tardive, qui formera le centre organisateur, avec un fragment de mésoderme ventral présomptif. Le fragment ventral formera dans ces conditions des quantités substantielles de muscles, alors qu'isolé d'une blastula précoce et cultivé seul, il produit principalement du tissu sanguin et du mésenchyme.

Ce type d'expériences, ainsi que d'autres observations, indiquent que l'induction et l'organisation initiale du mésoderme de xénope sont dues aux actions concertées d'une série de signaux émanant de différentes parties de l'embryon en développement (Fig. 4.18). La région végétative de la blastula produit initialement des signaux qui induisent le mésoderme. Le centre de Nieuwkoop dans la région végétative dorsale induit la formation du centre organisateur de Spemann sur le côté le plus dorsal, là où le signal inducteur est le plus fort et dure le plus longtemps. Un autre ensemble de signaux donne ensuite son identité au mésoderme ventral. En même temps, le centre organisateur émet encore d'autres signaux qui contrecarrent les signaux ventraux, en limitant leur portée d'action et ainsi, par exemple, de permettre au mésoderme dorsal de donner naissance à des somites. Le résultat de toute cette activité est la formation au niveau de l'équateur de la gastrula précoce d'une bande de mésoderme présomptif régionalisé selon l'axe dorso-ventral qui exprime des identités régionales distinctes.

4.10 Les protéines de la famille TGF-β sont des inducteurs du mésoderme

Les expériences de co-cultures d'explants suggèrent que les protéines de signalisation extracellulaires sécrétées depuis la région végétative de la blastula induisent le mésoderme. Mais quelles sont-elles ? Deux approches principales ont été utilisées pour les identifier. L'une d'entre elles a consisté à appliquer directement des protéines candidates sur des cultures de calottes animales isolées. L'autre a été d'injecter des ARNm d'inducteurs présumés dans des cellules animales de blastula précoce et ensuite de cultiver ces cellules. Cependant, la capacité d'une protéine à induire le mésoderme *in vitro* ne prouve pas qu'elle soit inductrice *in vivo*, dans l'embryon. Des critères rigoureux doivent être remplis avant qu'une telle conclusion puisse être formulée. Ceux-ci incluent la présence du signal inducteur et de son récepteur à la bonne concentration, au bon endroit et au bon moment dans l'embryon ; la démonstration que les cellules cibles peuvent répondre à ce signal ; et la démonstration que l'inhibition de la réponse cellulaire bloque l'induction. Les facteurs de croissance de la famille TGF- β (voir Encart 4C) répondent à ces critères et ont donc été identifiés comme étant les candidats les plus susceptibles d'être des inducteurs du mésoderme lors du développement précoce du xénope. Ce sont les protéines apparentées à Nodal (Nodal-related-1, -2, -4, -5, -6), la protéine Derrière, les protéines morphogénétiques osseuses (BMP), Vg-1, et l'activine.

Les voies de signalisation stimulées par les facteurs de croissance TGF- β sont illustrées dans l'Encart 4C. La confirmation du rôle de ces facteurs dans l'induction du mésoderme provient initialement d'expériences visant à bloquer l'activation de leurs récepteurs (Encart 4D). Le récepteur de type II de l'activine est un récepteur pour plusieurs facteurs de croissance de la famille des TGF- β et est uniformément distribué dans la jeune blastula de xénope. L'injection dans l'embryon précoce d'ARNm d'une sous-unité mutante du récepteur empêche



ENCART 4D Étude de la fonction d'un récepteur par l'utilisation de mutations dominantes négatives

Figure 1

Les récepteurs pour les protéines de la famille des TGF- β fonctionnent sous la forme de dimères associant des sous-unités de type I et II, la sous-unité de type II participant seulement à la fixation du ligand et celle de type I générant le signal intracellulaire (voir Encart 4C). Un moyen d'étude de la nécessité d'un récepteur particulier lors d'un processus du développement est de bloquer la fonction du récepteur (Figure 1). Dans le cas de récepteurs dimériques, cette fonction peut être bloquée en introduisant un ARNm codant une sous-unité mutée du récepteur dépourvue de la majeure partie de son domaine cytoplasmique, et par conséquent ne pouvant pas fonctionner. La sous-unité peut fixer le ligand et former des hétérodimères avec des sous-unités normales du récepteur, mais le complexe ne peut pas transmettre de signal. La sous-unité mutée agit selon un mode **dominant négatif** empêchant le fonctionnement du récepteur. Quand l'ARNm codant la sous-unité mutée du récepteur de l'activine est injecté dans les cellules d'un embryon de xénope au stade deux cellules, il s'ensuit un blocage de la formation du mésoderme. Ni mésoderme ni structures axiales ne sont formés à l'exception de la glande cémentaire, la structure la plus antérieure de l'embryon.

la formation de mésoderme suite au blocage de la signalisation TGF- β . Étant donné que les différents facteurs de croissance TGF- β peuvent agir *via* le même récepteur, ces expériences n'ont pas permis de déterminer l'implication exacte de chaque molécule.

Plus récemment, il est devenu possible d'étudier l'induction mésodermique en utilisant des inhibiteurs plus spécifiques des protéines Nodal, et aussi de détecter grâce à des anticorps marqués des facteurs de transcription activés par la signalisation TGF- β , les protéines Smad phosphorylées, et d'en distinguer leur type. Cette dernière technique permet de visualiser directement l'organisation spatiale et la dynamique de la signalisation normale du facteur de croissance, et elle est maintenant largement utilisée pour caractériser la signalisation des différents membres de la famille des TGF- β . Par exemple, la signalisation par les BMP peut être distinguée de celle des protéines apparentées à Nodal, ou de l'activine, en recherchant la forme phosphorylée de Smad1 ou de Smad2, respectivement (voir Encart 4C).

4.11 L'expression zygotique des signaux d'induction du mésoderme et du plan d'organisation est activée par l'action combinée des facteurs maternels VegT et Wnt

Un facteur végétatif maternel de grande importance au cours du stade le plus précoce de l'induction mésodermique est le facteur de transcription VegT (voir Section 4.4). Directement et indirectement, VegT active l'expression zygotique des gènes codant



Fig. 4.19 Un gradient de protéines apparentées à Nodal peut produire les signaux initiaux de l'induction mésodermique. VegT maternel dans la région végétative active la transcription des gènes nodal related. La présence de β-caténine nucléaire du côté dorsal stimule la transcription de nodal related, ce qui conduit à l'existence d'un gradient dorso-ventral des protéines apparentées à Nodal. Celles-ci induisent du mésoderme et, à fortes doses, spécifient l'organisateur de Spemann du côté dorsal. Ceci constitue une version simplifiée des phénomènes car d'autres signaux tels que Vg-1 et l'activine, jouent également des rôles. CNS, système nerveux central.

pour les protéines apparentées à Nodal et Derrière. Si VegT est drastiquement réduit, le mésoderme ne se développe pratiquement pas, et l'embryon est principalement constitué d'ectoderme, mais l'injection d'ARNm des protéines apparentées à Nodal et de Derrière peut restaurer la formation du mésoderme. Cela suggère fortement que les protéines de signalisation codées par ces ARNm sont les plus susceptibles d'être les inducteurs mésodermiques directs. Le sauvetage du mésoderme de la tête, du tronc et de la queue par les ARNm des protéines apparentées à Nodal indique que celles-ci sont impliquées dans l'induction générale du mésoderme. L'ARNm *derrière* ne sauve que le tronc et la queue, ce qui indique que la protéine Derrière seule ne peut pas induire le mésoderme le plus antérieur. Des analyses de l'activité des protéines apparentées à Nodal sur des cellules de calotte animale en culture ont cependant montré qu'elles peuvent former des dimères les unes avec les autres et avec Derrière et peuvent ainsi coopérer pour induire le mésoderme *in vivo*.

De nombreuses expériences ont maintenant montré que les protéines apparentées à Nodal sont exprimées dans la région végétative du xénope selon une gradation, au moment où se déroule l'induction mésodermique. La différence entre un devenir mésodermique dorsal et ventral est vraisemblablement due à la présence combinée de différentes de protéines apparentées à Nodal et/ou à des différences de leurs concentrations le long de l'axe dorso-ventral. La β -caténine nucléaire stimule l'expression de *nodal-related* et donc la concentration la plus élevée de protéines apparentée à Nodal sera produite par le centre de Nieuwkoop du côté dorsal de la région végétative où les cellules expriment VegT et contiennent également la β -caténine nucléaire (Fig. 4.19). La signalisation *via* des protéines apparentées à Nodal stimule la phosphorylation et l'activation de Smad2, et une vague d'activation de Smad2, détectée par des anticorps anti-phospho-Smad2, semble balayer l'embryon dans le sens dorso-ventral à partir du début de la mi-gastrulation. Toutes ces observations sont cohérentes avec l'induction de l'organisateur de Spemann dans la région équatoriale la plus dorsale où la signalisation Nodal est la plus intense et la plus longue (Fig. 4.19).

4.12 Des seuils de réponse aux gradients de protéines de signalisation modèlent le mésoderme

Les signaux induisant et structurant le mésoderme, décrits dans les sections précédentes exercent leurs effets en activant l'expression de gènes spécifiques nécessaires au développement ultérieur du mésoderme. La région la plus dorsale du mésoderme, où se trouve le centre organisateur de Spemann, produit la chorde, et les régions plus ventrales forment, par exemple, les muscles ou le sang. Le produit du gène *brachyury* est un facteur de transcription à boîte T (voir le Chapitre 1), qui est l'un des premiers marqueurs du mésoderme et un facteur de transcription clé dans la spécification et la structuration de celui-ci. L'expression de *brachyury* est présente dans tout le mésoderme présomptif de la blastula âgée et de la jeune gastrula (Fig. 4.20), pour ensuite être confinée aux territoires de la chorde et du bourgeon caudal (mésoderme postérieur). Divers membres de la famille du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) sont également exprimés dans le mésoderme de la blastula âgée et de la gastrula précoce (voir Encart 4E, la voie de signalisation FGF). Une des fonctions de la signalisation du FGF dans le mésoderme à ces stades est de maintenir l'expression de *brachyury*; à son tour, la protéine Brachyury assure le maintien de l'expression des gènes codant les FGF. Cette boucle de rétroaction positive (voir Fig. 1.21) entretient une forte expression de *brachyury* dans le mésoderme.

L'un des premiers gènes zygotiques à être exprimé spécifiquement dans le mésoderme le plus dorsal qui deviendra le centre organisateur de Spemann est *goose-coïd*, qui code un facteur de transcription un peu similaire aux protéines Gooseberry et Bicoid de la drosophile, d'où son nom. Conformément à son rôle dans le centre organisateur, la micro-injection d'ARNm *goosecoïd* dans la région ventrale d'une blastula de xénope imite dans une certaine mesure la transplantation du centre organisateur de Spemann (voir Fig. 4.5), entraînant la formation d'un axe secondaire. Les gènes pour d'autres facteurs de transcription sont également spécifiquement exprimés dans l'organiseur (Fig. 4.21 et voir tableau récapitulatif).

La façon dont les protéines de signalisation sécrétées et présentes dans le mésoderme activent des gènes comme *goosecoïd* et *brachyury* au bon endroit reste mal comprise. Par exemple, *brachyury* peut être activé expérimentalement dans les calottes animales du xénope par l'activine de la famille des TGF- β , mais il est plus susceptible de l'être dans le mésoderme présomptif *in vivo via* la signalisation Nodal, qui active également l'expression des FGF. Comme cela a été évoqué dans les sections précédentes, il existe des gradients d'activité des molécules de signalisation sécrétées dans tout le mésoderme qui pourraient fournir des informations de position pour activer des gènes de développement.

Des expériences avec l'activine de la famille TGF-ß fournissent un bel exemple de la façon dont une protéine diffusible peut modeler un tissu en activant des gènes particuliers à des concentrations seuils spécifiques. L'activine est l'une des molécules qui joue un rôle dans la structuration mésodermique in vivo et agit via le même récepteur que celui de Nodal. Les cellules d'explants de calotte animale d'une blastula de xénope en culture répondent à des doses croissantes d'activine en activant des gènes mésodermiques différents à diverses concentrations seuils. Dans les cultures d'explant, les concentrations croissantes d'activine spécifient plusieurs états cellulaires distincts qui correspondent aux différentes régions le long de l'axe dorso-ventral. Aux concentrations les plus faibles d'activine, seuls les gènes épidermiques sont exprimés et aucun mésoderme n'est induit. Puis, à mesure que la concentration augmente et dépasse une concentration seuil particulière, brachyury s'exprime, conjointement avec des gènes spécifiques des muscles tel que celui de l'actine. Avec une augmentation supplémentaire correspondant à la concentration de la région où se forme l'organisateur de Spemann, goosecoïd est exprimé (Fig. 4.22). Ainsi, la gradation du signal du facteur de croissance le long de l'axe dorso-ventral pourrait, en principe, activer des facteurs de transcription dans des régions particulières afin de modeler le mésoderme. Une augmentation de 1,5 fois de la concentration d'activine est suffisante pour former la chorde à la place de muscles dans les explants de calotte animale. La façon dont les gradients sont mis en place in vivo avec la précision nécessaire n'est

Fig. 4.21 Expression des gènes de facteurs de transcription dans des blastulas âgées/ jeunes gastrulas de xénope. Les domaines d'expression de plusieurs gènes zygotiques codant des facteurs de transcription correspondent assez bien aux limites de la carte des spécifications, si on en juge par la distribution de leurs ARNm. *brachyury* est exprimé selon un anneau autour de l'embryon qui coïncide assez étroitement avec le futur mésoderme (voir aussi Fig. 9.29). Plusieurs facteurs de transcription sont spécifiquement exprimés dans la région la plus dorsale du mésoderme à l'origine de l'organisateur de Spemann et sont nécessaires pour la fonction de ce dernier. La protéine Not apparaît avoir un rôle dans la spécification de la chorde ; les protéines Goosecoïd et Lim1 sont toutes les deux nécessaires pour qu'un organisateur de Spemann transplanté soit capable d'induire la formation d'une nouvelle tête.



Fig. 4.20 Expression de brachyury dans une blastula âgée de xénope. Une coupe transversale à travers l'embryon le long de l'axe animal-végétatif révèle que brachyury (en rouge) est exprimé dans le mésoderme présomptif. Barre d'échelle = 0,5 mm.

Photographie aimablement communiquée par M. Sargent et L. Essex.





gènes cibles à seuil bas gènes cibles à seuil élevé ex. brachyury ex. qoosecoïd Fig. 4.22 Gradation des réponses des cellules de la coiffe animale de xénope à des concentrations croissantes d'activine. Quand des cellules de la coiffe animale sont traitées avec des concentrations croissantes d'activine, des gènes particuliers sont activés pour des valeurs de concentration spécifiques, comme le montre le schéma du haut. Quand la concentration augmente, brachyury est induit, alors que goosecoïd, qui est caractéristique de la région de l'organisateur, n'est seulement induit qu'avec de fortes concentrations. Si des billes libérant de faibles quantités d'activine sont disposées au centre d'une masse de cellules de la coiffe animale (en bas à gauche), l'expression de gènes à réponse basse tel que brachyury est induite immédiatement autour des billes. Pour de fortes concentrations d'activine

sur les billes (en bas à droite), *goosecoïd* et d'autres gènes à niveau élevé de réponse s'expriment alors à proximité des billes et les gènes à bas niveau de réponses ne le font que dans une zone plus éloignée. pas claire. Bien que la simple diffusion des molécules de morphogène puisse jouer un rôle, des processus plus complexes sont susceptibles d'être impliqués. Certains mécanismes cellulaires courants qui pourraient être impliqués dans la formation d'un gradient sont indiqués dans l'Encart 11B.

Comment les cellules distinguent-elles les différentes concentrations de facteur de croissance ? L'occupation de seulement 100 récepteurs d'activine par cellule est nécessaire pour activer l'expression de *brachyury*, alors que 300 récepteurs doivent être occupés pour que *goosecoïd* soit exprimé. Le lien entre la force du signal et l'expression génique pourrait ne pas être si simple, cependant. Il existe d'autres niveaux de régulation intracellulaire qui agissent plus tard pour affiner les régions distinctes de l'expression génique dans l'embryon. Les cellules exprimant *goosecoïd* à des concentrations élevées d'activine répriment l'expression de *brachyury*, et ceci implique l'action de la protéine Goosecoid elle-même, conjointement avec d'autres protéines. À son tour, Brachyury inhibe indirectement l'expression de *goosecoïd*. La répression mutuelle de Brachyury et Goosecoïd permet de transformer le signal progressif d'activine en deux domaines discrets d'expression génique avec une frontière nette entre eux.

RÉSUMÉ

Les spécifications de l'endoderme et de l'ectoderme ont une origine maternelle chez le xénope, mais l'embryon présente néanmoins encore un pouvoir de régulation considérable au stade blastula. Cela implique que les interactions entre les cellules, plus que les facteurs intrinsèques, jouent un rôle central dans le développement précoce des amphibiens. La région organisatrice de Spemann et le reste du mésoderme sont induits à partir de l'ectoderme présomptif de la zone équatoriale de la blastula par des signaux provenant de la région végétative qui comprend le centre de Nieuwkoop dorsalement. Le modelage du mésoderme le long de l'axe dorso-ventral produit des régions qui, de ventral à dorsal, donnent naissance au sang et aux vaisseaux sanguins, aux organes internes tels que les reins, aux somites et à la région organisatrice du mésoderme le plus dorsal, qui produit la chorde.



Le centre organisateur de Spemann et l'induction neurale

Le centre organisateur de Spemann a une fonction globale d'organisation. Comme cela a été mentionné précédemment, il peut induire un deuxième axe corporel s'il est transplanté dans un autre embryon à un stade approprié, et entraîner la formation d'un embryon jumelé. En d'autres termes, il peut organiser et coordonner les dimensions dorso-ventrale et antéro-postérieure du plan corporel, ainsi que l'induction du tissu nerveux à partir de l'ectoderme. Son rôle a déjà été évoqué au cours de la structuration dorso-ventrale du mésoderme des embryons de xénope, en tant que

ENCART 4E La voie de signalisation FGF

Parmi beaucoup d'autres facteurs de croissance et de différenciation, dont la neuréguline, les FGF et EGF (pour Epidermal Growth Factor), importants facteurs de croissance du développement, transmettent un signal via des récepteurs transmembranaires à domaine intracellulaire tyrosine kinase. Différentes voies de signalisation liées à ces récepteurs contrôlent de nombreux aspects du comportement cellulaire au cours de la vie d'un individu. La voie de signalisation montrée ici est une version simplifiée de celle déclenchée par le FGF qui conduit à des changements de l'expression génique favorisant survie, croissance, division ou différenciation cellulaires en fonction des cellules impliquées et des conditions environnementales. Il existe de multiples formes de FGF et plusieurs récepteurs différents qui sont également utilisés dans des contextes variés. Par exemple, chez le xénope, FGF-4 est impliqué dans le maintien de l'expression de brachyury dans le mésoderme, et chez le poulet, FGF-8 intervient dans la signalisation à partir des centres organisateurs dans le développement du cerveau (abordé au Chapitre 12) cependant que FGF-10 est essentiel pour le développement des membres (évoqué au Chapitre 11).

La voie de signalisation intracellulaire passant par les récepteurs du FGF est souvent connue sous le nom de voie Ras-MAPK en raison de l'implication majeure de la petite protéine G Ras et de l'activation en cascade de sérine/théronine kinases qui se termine par l'activation d'une protéine kinase mitogène MAPK (pour *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Ce nom provient du fait que le FGF et d'autres facteurs de croissance peuvent agir en tant que mitogènes, c'est-à-dire des agents qui stimulent la prolifération cellulaire. Sous une forme ou une autre, le module central MAPK intervient dans des voies de signalisation partant de beaucoup de récepteurs tyrosine kinase différents (Figure 1).

La fixation d'un FGF extracellulaire sur son récepteur provoque une dimérisation de ce dernier, activant les domaines intracellulaires tyrosine kinase, qui se phosphorylent alors réciproquement. Les domaines intracellulaires phosphorylées du récepteur recrutent

générateur de signaux limitant la portée de l'action des signaux produits ventralement. La fonction du centre organisateur dans l'organisation de l'axe dorso-ventral va être maintenant considérée plus en détail, et en particulier la nature des molécules de signalisation impliquées. De même sera examinée sa fonction dans l'organisation de l'axe antéro-postérieur du mésoderme, qui émerge lors de la gastrulation.

Au cours de la gastrulation, l'ectoderme dans la région dorsale de l'embryon est spécifié en neuroectoderme neuronal et forme la plaque neurale à l'origine du système nerveux (voir Fig. 3.7). Celui-ci doit se développer en concordance avec les autres structures corporelles, en particulier les structures dérivées du mésoderme qui donnent naissance au système musculo-squelettique. Cela signifie que la mise en place antéro-postérieure du système nerveux et celle du mésoderme doivent être associées, et celles-ci sont contrôlées harmonieusement par le centre organisateur de Spemann. Seront donc considérés ici le rôle du centre organisateur dans l'induction de la plaque neurale et la façon dont la plaque neurale est régionalisée selon l'axe antéro-postérieur. Le centre organisateur de Spemann est localisé au niveau de la lèvre dorsale du blastopore, qui est le site où les mouvements de gastrulation sont initiés. Ces mouvements sont décrits au Chapitre 9.



Figure 1

des protéines adaptatrices, Grb et Sos, qui à leur tour recrutent et activent Ras au niveau de la membrane plasmique. Ceci se solde par la liaison et l'activation d'une première sérine/thréonine kinase qui, dans la voie mammalienne, est appelée Raf. Celle-ci phosphoryle et active une nouvelle protéine kinase, la MAPK kinase (MAPKK) qui phosphoryle et active la MAPK. Cette dernière peut ensuite phosphoryler d'autres kinases et en entrant aussi dans le noyau, phosphoryler des facteurs de transcription et activer ainsi une expression génique. Il y a plusieurs MAPK différentes dans les cellules de mammifères qui sont utilisées dans diverses voies et qui ciblent des facteurs de transcription différents.



Animation de la voie de signalisation FGF



Fig. 4.23 Distribution d'ARNm codant des protéines sécrétées dans des blastulas âgées/jeunes gastrulas de xénope. Les protéines sécrétées par l'organisateur bloquent l'action de BMP-4 et Wnt-8, ces protéines étant respectivement produites dans la totalité des blastulas âgées/jeunes gastrulas et dans le mésoderme présomptif, où leurs gènes sont exprimés. À noter que le gène codant la protéine apparentée Nodal-3, qui diffère des autres membres de la famille des protéines apparentées à Nodal, en ne possédant pas une activité inductrice directe du mésoderme, est également exprimé par l'organisateur. Frbz, frizzled related protein.



Fig. 4.24 Expression de *noggin* **dans des blastulas âgées de xénope.** La coloration de l'expression des ARNm *noggin* la situe dans la région où l'organisateur de Spemann se développera. Barre d'échelle = 1 mm.

Reproduit avec l'autorisation de Smith, W.C., Harland, R.M. : Expression cloning of noggin, a new Spemann organizer in Xenopus embryos. Cell 1992, 70 : 829-840. © 1992 Cell Press.

4.13 Des signaux issus du centre organisateur structurent le mésoderme dorso-ventral en bloquant les effets des signaux ventraux

Une des fonctions principales du centre organisateur est de favoriser la structuration du mésoderme de l'embryon suivant l'axe dorso-ventral. Comme cela a été vu précédemment, l'organisation du mésoderme dorso-ventral implique non seulement des signaux provenant de la région végétative de la blastula, mais aussi des signaux dorsalisants émanant du centre organisateur de Spemann, qui contrecarrent les signaux ventralisants produits par le côté ventral de l'embryon.

La ventralisation du mésoderme est favorisée par des gradients d'activité des protéines de signalisation BMP et Wnt plus concentrées du côté ventral de l'embryon. Initialement, la protéine BMP-4 et d'autres protéines BMP sont présentes dans l'intégralité de la blastula tardive/gastrula précoce. La protéine Wnt-8 zygotique est synthétisée dans le mésoderme présomptif à ces stades (Fig. 4.23). Lorsque l'action des BMP est bloquée dans tout l'embryon en introduisant un récepteur mutant dominant négatif (voir Encart 4D), l'embryon est dorsalisé, les cellules ventrales se différenciant à la fois en muscle et en chorde. Inversement, la surexpression de BMP-4 ventralise l'embryon.

La restriction de la signalisation BMP et Wnt-8 aux régions les plus ventrales de la gastrula est due à des signaux de dorsalisation extracellulaire qui sont sécrétés par le centre organisateur et inhibent, ou freinent, l'activité BMP et Wnt-8. Les premiers antagonistes découverts sont les protéines Noggin et Chordin qui inhibent toutes les deux l'activité BMP. Noggin, par exemple, a été découverte dans un criblage de facteurs susceptibles de sauvegarder les embryons de xénope ventralisés par irradiation aux UV. La région dorsale de ces embryons, présentant une forte expression de *noggin* au niveau du centre organisateur de Spemann (Fig. 4.24) n'avait pas été spécifiée par l'activité normale de la voie β -caténine (voir Section 4.2). La protéine Noggin ne peut pas induire de mésoderme à partir d'explants de calotte animale, mais elle peut dorsaliser les explants de la zone marginale ventrale, ce qui en fait un bon candidat comme signal qui organise le mésoderme dorso-ventralement. Il s'est avéré ensuite que le centre organisateur sécrétait un mélange d'antagonistes, à savoir les antagonistes de BMP, Noggin, Chordin et Follistatine, et la protéine apparentée à Frizzled (Frzb), antagoniste de Wnt.

L'identification des facteurs de dorsalisation comme étant des molécules secrétées antagonistes d'autres molécules de signalisation était complètement inattendue. En fait, la sécrétion d'antagonistes limitant une signalisation à une région particulière, ou modulant le niveau de signalisation, s'est avérée être une stratégie commune pendant le développement embryonnaire. Un exemple en a été donné dans la Section 4.2 avec un antagoniste de Wnt restreignant l'activation de la signalisation Wnt/β-caténine du côté dorsal de l'embryon très précoce, et d'autres exemples de ce type seront rencontrés dans le Chapitre 5.

Les protéines Noggin, Chordin et la Follistatine interagissent avec les protéines BMP et les empêchent de se lier à leurs récepteurs. Ceci établit un gradient fonctionnel de l'activité BMP suivant l'axe dorso-ventral de la gastrula de xénope, cette activité culminant ventralement et s'amenuisant voire disparaissant dans le mésoderme dorsal présomptif. Ce gradient n'est pas simplement dû aux antagonistes des BMP qui diffusent depuis le centre organisateur mais aussi à un mécanisme de navette (voir Encart 11B). Chordin produit dorsalement se lie aux BMP dans cette région, inhibant leur action et formant un complexe. Certaines BMP et molécules de type BMP dans la région dorsale de la gastrula sont paradoxalement produites par le centre organisateur lui-même. Le complexe Chordin-BMP diffuse alors de la région dorsale de l'embryon jusqu'à la région ventrale, où une métalloprotéase extracellulaire est produite et dégrade la partie Chordin du complexe, libérant ainsi BMP (Fig. 4.25). La métalloprotéase en éliminant Chordin, réduit l'étendue de la diffusion à distance de celle-ci et favorise le maintien de son gradient d'activité dorsalisant.

L'action de Chordin dans la genèse du gradient des BMP, dont BMP-4, s'apparente à celle de l'homologue de Chordin chez la drosophile, la protéine Sog qui interagit avec Decapentaplegic (Dpp), l'homologue de BMP-4, dans la structuration de l'axe dorso-ventral (voir Section 2.17). En revanche, l'axe dorso-ventral est inversé par rapport

à celui des vertébrés, et Dpp spécifie donc un devenir dorsal tandis que BMP-4 spécifie, lui, un devenir ventral (l'inversion de l'axe dorso-ventral au cours de l'évolution est abordée dans la Section 14.6). D'autres acteurs responsables du gradient d'activité Dpp chez la drosophile sont également conservés chez les vertébrés, la métalloprotéase de la mouche Tolloïd étant apparentée à celle du xénope.

L'antagoniste de Wnt, Frzb, génère également un gradient ventro-dorsal de l'activité Wnt dans la gastrula en se liant aux protéines Wnt et en les empêchant d'agir dorsalement. Un autre antagoniste de signalisation produit par le centre organisateur est Cerberus, qui inhibe l'activité des protéines BMP, Nodal et Wnt dans les tissus antérieurs présomptifs. Cerberus participe à la suppression d'un devenir mésodermique et à l'induction des structures antérieures, en particulier de la tête.

4.14 Émergence de l'axe antéro-postérieur de l'embryon au cours de la gastrulation

Le centre organisateur Spemann est situé au niveau de la lèvre dorsale du blastopore, et si cette dernière issue d'une très jeune gastrula est greffée sur la zone marginale ventrale d'une autre jeune gastrula, elle peut induire un deuxième embryon avec une tête bien définie, un système nerveux central, une région troncale et une queue (Fig. 4.26, à gauche, voir Fig. 4.5). La lèvre dorsale du blastopore de la gastrula précoce est donc considérée comme un « organisateur de la tête ». Diverses autres expériences, telles que la greffe ventrale de blastomères dorsaux végétatifs contenant le centre de Nieuwkoop, produisent un résultat similaire (voir Fig. 4.8). Ce que tous ces traitements ont en commun, c'est d'entraîner, directement ou indirectement, la formation d'un nouveau centre organisateur de Spemann avec sa fonction d'organisateur céphalique. Des expériences classiques ont également montré qu'une lèvre blastoporale dorsale prélevée au stade mi-gastrulation et greffée sur une gastrula précoce induit un tronc et une queue mais pas de tête, la lèvre dorsale du blastopore à ce stade fonctionnant alors en un « organisateur de tronc ». Une lèvre dorsale greffée provenant d'une gastrula âgée n'induit qu'une queue (Fig. 4.26, à droite).

Ces résultats montrent que les propriétés inductrices du centre organisateur changent avec le temps au cours de la gastrulation. Durant celle-ci, les cellules endodermiques dorsales et mésodermiques se meuvent autour de la lèvre dorsale du blastopore et s'internalisent en se déplaçant vers le pôle animal, ce qui génère l'axe antéro-postérieur perpendiculaire à l'axe dorso-ventral. Les cellules qui donnent lieu



Fig. 4.25 Un mécanisme de navette génère un gradient dorso-ventral de la signalisation BMP dans la gastrula. (1) Chordin (en rouge) sécrétée par l'organisateur se lie à BMP (en vert) dans la région dorsale de l'embryon. Certaines molécules de signalisation BMP et de type BMP sont sécrétées dans l'ensemble des cellules de la jeune gastrula, d'autres sont sécrétées par l'organisateur même. (2) Le complexe chordin-BMP diffuse ventralement. (3) Dans la région ventrale, Chordin est clivée par une métalloprotéinase produite dans cette zone, ce qui libère BMP et permet son dépôt ventralement. Ce mécanisme de navette génère un gradient de la signalisation BMP traversant l'embryon avec des valeurs élevées ventrales (couleur de fond vert) et des valeurs faibles dorsales (couleur de fond rouge).

D'après Lewis, J. : From signals to patterns : space, time, and mathematics in developmental biology. Science 2008, 322 : 399-403.



Fig. 4.26 Les propriétés inductives de l'organisateur changent au cours de la gastrulation. Une greffe de la région de l'organisateur, la lèvre dorsale du blastopore d'une jeune gastrula de xénope, sur le côté ventral d'une autre jeune gastrula, provoque la formation d'embryons jumelés, avec le second embryon induit par la greffe qui possède une tête (schémas de gauche). Une greffe de la région de la lèvre dorsale d'une gastrula âgée dans une jeune gastrula n'induit pas seulement que des structures caudales (schémas de droite). A = antérieur ; P = postérieur ; D = dos. Fig. 4.27 Une régionalisation de l'organisateur du xénope est à l'origine de différents tissus. Chez la jeune gastrula (à gauche), l'organisateur est localisé au niveau de la lèvre dorsale du blastopore. Les cellules du futur front de migration (en orange) sont les premières à s'internaliser et sont à l'origine de l'endoderme antérieur au stade neurula (à droite). Les cellules plus profondes (en brun) s'internalisent ensuite et donnent la plaque préchordale, le mésoderme situé à l'avant de la chorde et qui forme le mésoderme ventral céphalique. Le restant de l'organisateur donne naissance à la chorde (en rouge).

D'après Kiecker, C., Niehrs, C. : **A morphogen** gradient of Wht/β-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus. Development 2001, **128 :** 4189-4201.



Film montrant la gastrulation chez le *xénope*



à des structures antérieures s'internalisent en premier suivies de celles à l'origine de plus de structures postérieures. Cela signifie que la région de la lèvre blastoporale dorsale n'est pas assimilable à une population cellulaire homogène mais est au contraire composée de différentes populations cellulaires au cours du temps. Ceci explique les propriétés organisatrices et inductrices complexes du centre organisateur et pourquoi les propriétés inductrices des greffons de la lèvre dorsale du blastopore changent avec le temps.

Des cartes détaillées du devenir de la lèvre dorsale du blastopore de la jeune gastrula de xénope, organisatrice céphalique, montrent qu'elle est composée de différentes régions cellulaires à l'origine, lors de la gastrulation, de l'endoderme antérieur, du mésoderme préchordal et de la chorde (Fig. 4.27). Le mésoderme de la plaque préchordale à l'extrémité antérieure de la chorde, forme le mésoderme ventral céphalique. Au stade gastrula âgée, cependant, la lèvre dorsale du blastopore sera simplement composée de cellules donnant naissance à la chorde. Les expériences dédiées à la capacité inductive des différentes parties du centre organisateur de la gastrula précoce, montrent que la capacité d'induire la formation d'une tête est limitée à la région végétative (rouge brun, Fig. 4.27). La partie la plus dorsale du centre organisateur (en rouge, figure 4.27) peut induire des structures du tronc et de la queue mais pas de la tête.

Un certain nombre de protéines sont spécifiquement exprimées dans le centre organisateur du xénope et requises pour sa fonction (Fig. 4.28 et voir tableau récapitulatif). Ces protéines comprennent un certain nombre de facteurs de transcription. L'existence de Goosecoïd a, par exemple, déjà été évoquée, et est un marqueur précoce et fiable du centre organisateur (voir la Section 4.12). Goosecoïd est présent dans toutes les cellules du centre organisateur de la jeune gastrula et est nécessaire pour la formation de la tête au cours du développement. La partie végétative du centre organisateur produit des protéines telles que le facteur de transcription Otx2, qui est caractéristique des structures antérieures, et le facteur de transcription Lim1, dont le gène est activé par VegT. La partie dorsale du centre organisateur produit le facteur de transcription Not, nécessaire à la spécification de la chorde.

Protéines exprimées dans la région de l'organisateur					
Gastrula de xénope	Facteurs de transcription	Protéines sécrétées			
	Brachyury, Goosecoid	Nodal-related 3			
mésoderme organisateur	Not	Chordin, Noggin			
	Otx2, Lim1	Cerberus			

Fig. 4.28 Protéines présentes dans la région de l'organisateur de la gastrula de xénope. La production de certaines de ces protéines, telle Brachyury, ne se cantonne pas qu'au niveau de l'organisateur.

Fig. 4.29 La signalisation Wnt spécifie l'axe dorso-ventral dans les jeunes embryons de xénope avant la gastrulation, cependant qu'une seconde vague de signalisation Wnt après la gastrulation met en place un patron pour l'axe antéro-postérieur. Avant la gastrulation, l'accumulation nucléaire de β-caténine qui suit la rotation corticale spécifie la future région dorsale de l'embryon (à gauche). À ces stades précoces, la signalisation Wnt est sous la forme d'un gradient avec son point le plus haut du côté dorsal de l'embryon, ce qui contribue à la spécification du centre de Nieuwkoop et de l'organisateur en activant les gènes qui spécifient le mésoderme dorsal et les gènes exprimés dans l'organisateur, dont les antagonistes de Wnt. Le gène zygotique wnt8 est activé dans le mésoderme chez la blastula âgée. Durant la gastrulation, les antagonistes sécrétés par l'organisateur inhibent la signalisation Wnt dans le mésoderme dorsal et antérieur. Après la gastrulation, la signalisation est maintenant gradée le long de l'axe antéro-postérieur de la gastrula avec son point le plus haut dans la région postérieure de l'embryon. Des gènes cibles sont activés dont ceux codant des facteurs de transcription impliqués dans la spécification du mésoderme ventral et le mésoderme postérieur qui plus tard sera à l'origine de la queue du têtard (à droite). D, dos ; V, ventre ; A, antérieur ; P, postérieur.

D'après Hisaka, H., Sokal, S.Y. : **Wnt Signaling in Vertebrate Axis Specification**. Cold Spring Harb. Perspect. 2013, 5 : a007955.

Le centre organisateur sécrète un ensemble d'antagonistes de la signalisation BMP et Wnt, les protéines Chordin, Noggin et la Follistatine, et les protéines Frzb et Dick-kopf1 s'opposant, respectivement, aux BMP et Wnts. Un peu paradoxalement, le centre organisateur sécrète également des molécules de signalisation : BMP-2, une protéine de signalisation apparentée à BMP, et une protéine apparentée à Nodal qui n'a aucune activité inductrice mésodermique directe. La protéine Cerberus, antagoniste des signalisations Wnt, Nodal et BMP, est produite par la région du centre organisateur qui donne naissance à l'endoderme antérieur. L'importance des antagonistes de BMP produits par le centre organisateur dans la création d'un gradient de signalisation BMP a déjà été évoquée, celle-ci structurant l'axe dorso-ventral du mésoderme de la gastrula (voir Sections 4.17 et 4.18). La sécrétion d'antagonistes de Wnt par l'organisateur produit également un gradient de signalisation Wnt/ β -caténine, de sorte qu'au niveau du centre organisateur lui-même, les niveaux de signalisation BMP et Wnt sont faibles.

Chez la jeune gastrula, le gradient de signalisation Wnt fournit des informations de position le long de l'axe antéro-postérieur. Cette fonction ultérieure de la signalisation Wnt contraste avec sa fonction précédente de spécification du côté dorsal de l'embryon, dont il a été question précédemment (Fig. 4.29). Le facteur essentiel pour la formation de la tête est l'inhibition dans les tissus antérieurs des signaux Nodal, BMP et Wnt. Une tête surnuméraire peut être induite dans la région ventrale d'une gastrula précoce par l'inhibition simultanée des signalisations BMP et Wnt, ou des signalisations Nodal et BMP. La queue se forme là où les signalisations BMP et Wnt sont élevées.

Ces observations et résultats expérimentaux ont conduit à un modèle de développement précoce du xénope qui intègre les gradients orthogonaux de BMP et de Wnt dans un système de coordonnées tridimensionnelles d'informations de position dû aux gradients de morphogènes (les gradients de BMP et de Wnt), ce système fournissant un patron d'organisation pour les axes embryonnaires de la gastrula (Fig. 4.30). Des gradients de morphogènes orthogonaux fonctionnent également pour modeler l'aile de la drosophile (voir Chapitre 11), et constituent une manière classique de modeler un tissu embryonnaire.

4.15 La plaque neurale est induite à partir de l'ectoderme

L'expérience de greffe de l'organisateur de Spemann chez les tritons illustrée Fig. 1.9 et les expériences ultérieures chez le xénope (voir Fig. 4.5 et 4.26) ont montré que le tissu nerveux est induit à partir de l'ectoderme. Au sein du deuxième axe embryonnaire se formant au site de transplantation de l'organisateur de Spemann, un système nerveux se développe à partir de l'ectoderme hôte destiné normalement à former l'épiderme ventral. On en conclut que le tissu nerveux peut être induit par des signaux émanant du centre organisateur qui a pour cible l'ectoderme encore indéterminé. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences dans lesquelles l'ectoderme





Fig. 4.30 Modèle du double gradient pour la formation de l'axe embryonnaire. Le modèle présenté montre comment les gradients perpendiculaires des protéines Wnt (en bleu) et BMP (en vert), régulent l'organisation antéro-postérieure et dorso-ventrale du xénope. La gradation de coloration représente celle des signalisations, les flèches indiquant le sens de diffusion des signaux. À titre d'exemple, la formation de la queue requiert un niveau plus élevé du signal Wnt que celui au niveau de la tête. La mise en place du patron de l'organisation corporelle débute lors de la gastrulation, mais à des fins de clarté, elle est décrite ici chez une jeune neurula.

D'après Niehrs, C. : **Regionally specific induction by the Speman-Mangold organiser**. Nat. Rev. Genet. 2004, **5 :** 425-434.

présomptif des plaques neurales a été remplacé par de l'épiderme présomptif avant la gastrulation. L'épiderme présomptif transplanté s'est développé en tissu nerveux (Fig. 4.31). Ceci montre que la formation du système nerveux dépend d'un signal inductif.

Un effort conséquent a été consacré dans les années 1930 et 1940 à l'identification des signaux spécifiquement impliqués dans l'induction neurale chez les amphibiens. Les chercheurs y furent encouragés par la découverte qu'une région organisatrice broyée pouvait encore induire des tissus nerveux. Il semble que cela fut un dur labeur que d'isoler les molécules responsables, et la recherche s'avéra plutôt infructueuse, une vaste gamme de substances différentes se révélant capables d'induire à des degrés divers un tissu nerveux. Rétrospectivement, la raison de cet échec est liée à l'ectoderme de triton, principal matériau expérimental utilisé, qui a une forte propension à se développer de lui-même en tissu neural. Ce n'est pas le cas avec l'ectoderme de xénope, bien que la simple dissociation de ses cellules nerveuses suite à leur réagrégation.

Une avancée décisive dans l'étude de l'induction neurale a été la découverte que l'antagoniste de BMP, Noggin, une des premières protéines sécrétées isolées de



Fig. 4.31 Le système nerveux du xénope est induit durant la gastrulation. Les figures de gauche montrent l'évolution normale du devenir de deux emplacements différents de l'ectoderme d'une jeune gastrula. Les figures de droite montrent la transplantation d'un fragment d'ectoderme ventral d'une jeune gastrula, dont la destinée normale est de former de l'épiderme, sur le côté dorsal d'une autre gastrula, en remplacement d'un fragment qui lui a été prélevé et qui aurait participé à la formation du tissu nerveux. À cette nouvelle place, l'épiderme présomptif transplanté ne se développe pas en épiderme mais en tissu neural, et est intégré dans le système nerveux central. Ceci montre que le tissu ventral n'était pas encore déterminé au moment de la transplantation, et que l'induction du tissu neural s'effectue au cours de la gastrulation.

l'organisateur de Spemann, pouvait induire une différenciation neurale à partir d'explants ectodermiques de blastula de xénope. Dans la blastula âgée, les gènes *bmp* sont exprimés dans tout l'ectoderme, mais leur expression est ensuite absente de la plaque neurale. Ces résultats suggéraient que la plaque neurale ne pouvait se développer qu'en absence de la signalisation BMP. Cette conclusion est étayée par l'effet spectaculaire de la suppression simultanée de la production de BMP-4 et des trois autres BMP exprimées dans la blastula âgée avec des oligonucléotides morpholino antisens (voir Encart 6B). Cette suppression conduit au développement d'un embryon recouvert de tissu neural (Fig. 4.32). Les antagonistes de BMP tels que Noggin et Chordin produits par le centre organisateur (voir Fig. 4.28) sont donc devenus des candidats plausibles qui, en inhibant la signalisation BMP, permettent l'induction neurale dans la plaque neurale présomptive. Comme la signalisation BMP entretient l'expression des gènes *bmp*, cette dernière est censée être aussi affectée par l'inhibition de la signalisation BMP.

Ces observations ont abouti au « modèle par défaut » de l'induction neurale chez le xénope. Celui-ci stipule que l'ectoderme dorsal se développe par défaut en tissu neural, mais que cette voie est bloquée par la présence de BMP qui promeut le devenir épidermique (Fig. 4.33). Le rôle de l'organisateur est de lever cette inhibition en produisant des protéines qui inhibent l'activité BMP, et la région de l'ectoderme sous l'influence de l'organisateur se développe alors comme neuroectoderme. Suivant ce modèle, les antagonistes sécrétés par l'organiseur agissent sur l'ectoderme qui se trouve à côté de l'organisateur au début de la gastrulation. Au fur et à mesure que la gastrulation progresse, les cellules internalisées dérivées de l'organisateur continuent à sécréter ces antagonistes qui agissent sur l'ectoderme qui les recouvre (voir Fig. 4.27).

Les effets de l'élimination un par un des antagonistes de BMP chez les amphibiens sont plutôt modestes sur l'induction neuronale. Mais leur élimination de façon groupée avec des oligonucléotides morpholino antisens, par exemple de Chordin, Noggin et Follistatine, ou encore de Cerberus, Chordin et Noggin, conduit à une inhibition du développement neuronal et dorsal, et à une expansion ventrale et postérieure. Ces expériences montrent que les inhibiteurs de BMP, qui sont produits au bon endroit et au bon moment, sont nécessaires pour l'induction neurale.

Le modèle de l'induction neurale par défaut n'explique pas tout cependant, car le développement neuronal chez le xénope exige également l'intervention du facteur de croissance FGF, même lorsque l'inhibition due à BMP est levée par la présence de Noggin et de Chordin. Les signaux FGF sont produits par des cellules de la blastula et on pense qu'ils agissent en tant qu'inducteurs neuronaux précoces. Il a été aussi montré que la différenciation apparemment spontanée d'un greffon ectodermique de triton en tissu neural est provoquée par l'activation de la voie de signalisation





Fig. 4.32 En l'absence de signalisation BMP, l'embryon devient recouvert de tissu nerveux cérébral. À gauche : embryons normaux de xénope au stade neurula dont les colorations bleues indiquent l'expression d'un marqueur neural, l'ARNm *Sox2* (en haut) et d'un marqueur épidermique, l'ARNm *cytokeratin* (en bas). À droite : embryons de xénope au stade neurula qui ont subi simultanément une déplétion des quatre ARNm *bmp* suite à l'injection de morpholinos antisens au stade 2-4 cellules, et qui ont été colorés de façon similaire aux embryons de gauche. Les embryons sans BMP sont complètement recouverts par du tissu neural.

D'après De Robertis, E.M. : **Spemann's** organizer and the self-regulation of embryonic fields. Mech. Dev. 2009, **126** : 925-241.

Fig. 4.33 L'inhibition de la signalisation BMP est nécessaire pour l'induction de la plaque neurale. BMP (en vert) est présent dans l'ensemble de l'ectoderme de la blastula. Chez la jeune gastrula, les antagonistes de BMP sécrétés par l'organisateur inhibent, dans les régions voisines de celui-ci, la signalisation BMP dans les trois feuillets embryonnaires. Cette action négative n'est pas suffisante en elle-même pour induire la formation du tissu neural à partir de l'ectoderme, et une intervention précoce positive de la signalisation FGF, originaire des cellules de la blastula, est également nécessaire.



Fig. 4.34 Résumé des signaux actifs et antagonistes dans différents feuillets embryonnaires aux stades blastula âgée et gastrula. Chez le xénope, quatre familles principales de protéines de signalisation sécrétées sont impliquées dans la spécification des feuillets embryonnaires et dans la mise en place de leurs patrons : Wnt, FGF, BMP et Nodal. Le lettrage et le fléchage en vert indiquent un signal actif. Le lettrage noir et les traits barrés bleus indiquent l'inhibition d'un signal.

D'après Heasman, J. : **Patterning the early Xenopus embryo**. Development 2006, **133 :** 1205-1217. Ras-MAPK. L'activation de cette voie se produit suite à un signal FGF (voir Encart 4E) et le traitement de l'explant ectodermique de triton greffé avec des petites molécules inhibitrices de cette voie empêche la différenciation neuronale. La voie de signalisation Ras-MAPK est également activée lorsque des cellules ectodermiques de xénope sont dissociées, ce qui pourrait expliquer, rétrospectivement pourquoi cette dissociation induit si facilement un devenir neuronal. L'induction de la plaque neurale implique en conséquence, non seulement des antagonistes de la signalisation BMP mais aussi la signalisation FGF.

Les effets du FGF dans l'induction neurale ne sont pas tous directs. Activé, MAPK peut interférer avec la signalisation BMP en provoquant une phosphorylation inhibitrice de Smad1, élément de la voie de signalisation intracellulaire stimulée par les BMP (voir Encart 4C). Par conséquent, la signalisation FGF pourrait également contribuer à l'inhibition de la signalisation BMP, et pourrait de cette façon favoriser l'induction neurale.

En simplifiant un peu le processus d'induction neurale, il est possible de dire que le rôle de l'organisateur est similaire dans la mise en place de l'organisation de l'ectoderme et du mésoderme. Celle de l'endoderme est nettement moins bien comprise, mais il a été montré que les antagonistes de BMP peuvent induire des explants de cellules de calotte animale à former de l'endoderme. Cet effet suggère que l'organisateur peut modeler les trois feuillets embryonnaires en s'opposant à la signalisation BMP dans le tissu qui lui est adjacent (voir Fig. 4.33). Le tableau récapitulatif récapitule les principaux gènes impliqués dans la formation des axes, et dans la spécification et l'organisation des feuillets embryonnaires chez le jeune xénope. La Figure 4.34 dresse un inventaire des voies de signalisation actives et inhibées dans les différents feuillets embryonnaires au stade blastula âgée. Les quatre principales voies de signalisation sont les voies TGF- β (Nodal et BMP), FGF et Wnt. La spécification et l'organisation des trois feuillets requièrent non seulement l'activation de voies de signalisation particulières, mais aussi de s'assurer que les autres voies sont bien inactives. Tout utile que soit ce diagramme, il faut garder à l'esprit que le développement du plan d'organisation du xénope ne dépend pas simplement de la présence ou l'absence de signaux particuliers dans différentes régions de l'embryon, mais aussi de la gradation et de la durée de la signalisation.

4.16 Le système nerveux est structuré par des signaux mésodermiques le long de l'axe antéro-postérieur

Le développement des structures neurales le long de l'axe antéro-postérieur est régi par des signaux provenant du mésoderme dorsal sous-jacent. Des expériences classiques ont montré que des morceaux de mésoderme pris à différents endroits de l'axe antéro-postérieur d'une neurula de triton et placés dans le blastocœle d'un jeune embryon de triton induisent des structures neurales au site de transplantation qui correspondent plus ou moins à la position d'origine du mésoderme transplanté. Des morceaux de mésoderme antérieur induisent la formation d'une tête et d'un cerveau, tandis que des morceaux postérieurs induisent un tronc et la moelle épinière (Fig. 4.35).

Ces expériences de greffes ont permis de suggérer dans un premier temps que le mésoderme sous-jacent de la plaque neurale produit selon l'endroit de l'axe antéro-postérieur des signaux différents, le mésoderme antérieur produisant un signal induisant le cerveau et le mésoderme postérieur émettant un signal qui induit la moelle épinière. Il s'avère que la signalisation issue du mésoderme est différenciée qualitativement mais aussi quantitativement en ce qui concerne la formation du patron neural antéro-postérieur.

Selon les endroits sur l'axe antéro-postérieur, des inducteurs différents sont sécrétés par le mésoderme. Au stade neurula, les antagonistes de Wnt tels que Cerberus, Dickkopf1 et Frzb sont principalement sécrétés par l'endoderme antérieur et le mésoderme situé sous la future tête, tandis que les antagonistes de BMP sont sécrétés à partir du mésoderme situé sous la tête et le tronc. L'action combinée des antagonistes de BMP et de Wnt produits par le mésoderme antérieur pourrait donc favoriser le développement du cerveau à partir de la région antérieure de la plaque neurale alors que les



antagonistes de BMP agissant seuls pourraient induire la moelle épinière à partir de la plaque neurale postérieure. Lorsque l'antagoniste de Wnt, Dickkopf1, est surexprimé, il n'est capable d'induire des têtes supplémentaires qu'associé avec des antagonistes de BMP. Cela montre que l'inhibition combinée de la signalisation BMP et Wnt est bien requise pour imiter l'action du mésoderme antérieur.

Il existe également des différences quantitatives dans la signalisation Wnt/β-caténine le long de l'axe antéro-postérieur chez la neurula. Les niveaux de signalisation Wnt/ β-caténine augmentent progressivement d'avant en arrière, ce qui entraîne un gradient antéro-postérieur croissant de Wnt/β-caténine chez l'embryon (voir Fig. 4.29). Ce gradient semble modeler la plaque neurale, des concentrations plus élevées de Wnt conférant une valeur positionnelle de type postérieur (Fig. 4.36). Dans les explants de calotte animale issus d'embryons chez lesquels ont été injectés des ARNm codant l'antagoniste de BMP, Noggin, et utilisés en tant que tissu antérieur « neuralisé », des niveaux croissants de la signalisation Wnt induisent l'expression de différents gènes postérieurs. Les FGF agissent également comme facteurs postériorisant. Ainsi, l'organisation neurale antéro-postérieure peut s'expliquer à la fois par des différences quantitatives et qualitatives de signalisation.

4.17 Le plan d'organisation final de l'embryon se manifeste à la fin de la gastrulation et à la neurulation

La gastrulation transforme la blastula sphérique du xénope en un embryon présentant les trois feuillets embryonnaires dans leur position corporelle finale. Le futur mésoderme dorsal de la blastula âgée est internalisé au cours de la gastrulation pour former le mésoderme de la plaque préchordale. Celle-ci est située antérieurement à la chorde, et donne naissance au mésoderme ventral de la tête. L'organisateur internalisé produit également la chorde, baguette rigide s'étirant le long de la ligne médiane dorsale. De part et d'autre de la chorde, se trouve plus ventralement le mésoderme para-axial qui, à la fin de la gastrulation, commence à se segmenter à partir de la région antérieure pour former les somites (Fig. 4.37, à gauche). La chorde des vertébrés est une structure transitoire, et ses cellules s'incorporeront ultérieurement dans les vertèbres et les disques vertébraux. À l'issue de la gastrulation, se manifeste le début de la formation du système nerveux, ou neurulation. La portion d'ectoderme au-dessus de la chorde, le neuroderme, forme de chaque côté de la ligne médiane des replis qui, en se rencontrant au niveau de celle-ci, constituent une structure tubulaire, le tube neural (voir Fig. 3.7). La structure interne de l'embryon de xénope, juste après la fin de la neurulation, est illustrée Fig. 4.37 (au centre et à droite). Les principales structures identifiables sont le tube neural, la chorde, les somites, le mésoderme des lames latérales, ventral par rapport aux somites, l'endoderme bordant le tube digestif et l'épiderme recouvrant tout l'embryon. À ce stade, le plan corporel de base est similaire chez tous les embryons de vertébrés.

Fig. 4.35 L'induction du système nerveux par le mésoderme est régionalisée. Des fragments mésodermiques issus de localisations différentes le long de l'axe antéro-postérieur dorsal de jeunes neurulas de triton, transplantés dans les régions ventrales de jeunes gastrulas, induisent des structures neurales correspondant

à leur région d'origine. Un fragment mésodermique antérieur induit une tête avec un cerveau (en haut), cependant qu'issu d'une région postérieure, il forme un tronc postérieur avec une moelle épinière s'achevant dans une queue (en bas).

Illustration d'après Mangold, O. : **Über die** induktionsfahigkeit der verschiedenen bezirke der neurulavon urodelen. Naturwissenschaften 1933, **21 :** 761-766.



Fig. 4.36 Le mésoderme est responsable du patron de la plaque neurale. Des différences quantitatives d'un signal le long de l'axe peuvent aider à la mise en place du patron de la plaque neurale. Par exemple, l'intensité de la signalisation β -caténine qui augmente de la région antérieure vers la région postérieure, et les niveaux élevés présents à l'extrémité postérieure, confèrent une valeur de position plus postérieure dans la plaque neurale.

Illustration d'après Kelly, O.G., Melton, D.A. : Induction and patterning of the vertebrate nervous system. Trends Genet. 1995, 11 : 273-278.



Fig. 4.37 le plan corporel final de l'embryon apparaît lors de la gastrulation et la neurulation. À gauche, schéma d'une coupe sagittale d'un embryon de xénope au stade bourgeon caudal (stade 22) qui succède à la gastrulation et à la neurulation. Les feuillets embryonnaires sont maintenant tous en place pour la poursuite du développement et l'organogenèse. Le mésoderme est à l'origine de la plaque préchordale (en brun), la chorde (en rouge), les somites (en orange), et le mésoderme des lames latérales (non visibles sur ce type de coupe). L'endoderme (en jaune) est intériorisé et borde le tube digestif. Le tube neural (en bleu sombre) s'est formé à partir de l'ectoderme dorsal et l'ectoderme qui formera l'épiderme (en bleu pâle) recouvre la totalité de l'embryon. L'axe antéro-postérieur s'est concrétisé avec la différenciation d'une tête à l'extrémité antérieure. A, antérieur ; P, postérieur. Au centre et à droite : coupes transversales d'un embryon de xénope au stade 22. Les parties les plus dorsales des somites ont déjà commencé à se différencier en dermomyotome, qui sera à l'origine des muscles du tronc et des membres ainsi que du derme, cependant que la partie ventrale des somites, le sclérotome, donnera la colonne vertébrale, comme cela est décrit dans le Chapitre 5. Barre d'échelle valable pour les seules figures du centre et à droite = 0,2 mm.

Photographie reproduite avec l'autorisation de Hausen, P., Riebesell, M. : **The Early Development of Xenopus laevis.** Berlin : Springer-Verlag, 1991.

RÉSUMÉ

L'organisation du jeune embryon de xénope par rapport aux axes antéro-postérieur et dorso-ventral, est étroitement liée à l'action du centre organisateur de Spemann et à sa morphogenèse au cours de la gastrulation. L'organisateur sécrète des antagonistes de facteurs de croissance, qui inhibent les actions des BMP et Wnt. Il établit des gradients de signalisation BMP depuis la région ventrale vers la dorsale, ce qui organise l'axe dorso-ventral, et un gradient Wnt, depuis la région antérieure vers la postérieure structurant l'embryon suivant l'axe antéro-postérieur. La formation du système nerveux des vertébrés à partir de la plaque neurale, dépend à la fois des premiers signaux de l'organisateur et des signaux provenant du mésoderme qui vient se placer lors de la gastrulation sous l'ectoderme constituant la plaque neurale présomptive. L'inhibition de la signalisation BMP par des protéines produites par l'organisateur, telle que Noggin, est nécessaire pour l'induction neurale. L'organisation de la plaque neurale résulte de modulations à la fois quantitatives et qualitatives de la signalisation émanant du mésoderme sous-jacent, de forts signaux Wnt et FGF spécifiant les valeurs de position les plus postérieures.

Mise en place du plan d'organisation du poisson-zèbre

Le plan corporel du poisson-zèbre s'établit de façon similaire à celui du xénope et beaucoup de molécules identiques sont impliquées. Il y a cependant, beaucoup plus de vitellus dans l'œuf du poisson-zèbre que dans celui du xénope et les divisions de clivage n'affectent pas l'ensemble de l'œuf, ce qui se répercute sur la formation de l'endoderme. Au stade de sphère, qui est l'équivalent du stade blastula chez le xénope, l'embryon est sous la forme d'un blastoderme situé au-dessus de la masse vitelline cellulaire (voir Fig. 3.11). En quoi l'étude du poisson-zèbre apporte-elle un plus pour la compréhension de la mise en place du plan d'organisation corporelle des vertébrés ? Comme pour le xénope, il est possible de pratiquer des expériences classiques en embryologie, comme par exemple des transplantations ectopiques de cellules dans l'embryon. De plus, les poissons-zèbres sont de bons modèles pour des analyses génétiques et, par exemple, le criblage des mutations provoquant des défauts corporels peut permettre d'identifier les gènes impliqués. Ces cribles ont en fait fourni peu de surprises, et ceci indique qu'en général les mêmes familles de facteurs de transcription et de protéines de signalisation sont en jeu dans la mise en place du plan corporel à la fois chez le xénope et le poisson-zèbre. Un autre avantage du poisson-zèbre comme modèle est la transparence de ses embryons, ce qui a permis le suivi individuel de cellules dans l'embryon précoce. Ce chapitre sera centré sur les principes généraux, en mettant en évidence les points où l'étude du poisson-zèbre a apporté des données pertinentes. Seront également mentionnées quelques différences significatives existant entre le xénope et le poisson-zèbre.

4.18 Les axes corporels du poisson-zèbre sont établis par des déterminants maternels

Les tout premiers stades du développement du poisson-zèbre sont, comme pour le xénope, exclusivement sous le contrôle de facteurs maternels mis en place dans l'œuf et qui, transmis ensuite dans différents blastomères au cours du clivage, détermineront le devenir de ces derniers. Chez le poisson-zèbre, les facteurs maternels sont distribués le long de l'axe animal-végétatif et les facteurs essentiels pour la formation de l'axe sont situés dans la région végétative. L'importance de ces facteurs localisés est démontrée par le fait que la suppression de la partie du vitellus la plus proche de la région végétative avant la première division de l'œuf fécondé se solde par la formation d'embryons à symétrie radiaire dépourvus de structures dorsale et antérieure. L'axe dorso-ventral est aussi spécifié chez le poisson-zèbre par l'activation de la signalisation Wnt *via* la β -caténine dans les cellules du futur côté dorsal, ce qui détermine où se développera l'organisateur constitué par l'écusson chez le poisson-zèbre.

Le poisson-zèbre a fourni génétiquement la preuve de l'importance de la voie Wnt/ β -caténine dans la spécification dorsale. Des mutants chez lesquels l'expression d'éléments de cette voie est affectée, ont été isolés. Pour le mutant *ichabod*, chez lequel la mutation se situe près du gène *beta-catenin2*, l'expression de la protéine β -caténine 2 est régulée à la baisse et les embryons présentent une symétrie radiale. Chez le poisson-zèbre, le facteur maternel dorsalisant est l'ARNm *wnt8a* plutôt que les ARNm *wnt11* et *wnt5a* du xénope. L'ARNm *wnt 8a* migre depuis les régions végétatives vers le pôle animal sur des rangées parallèles de microtubules qui s'assemblent rapidement après la fécondation. À la différence du xénope, cependant, chez lequel le point d'entrée du spermatozoïde détermine la direction de la rotation corticale, la manière dont les microtubules sont orientés chez le poisson-zèbre reste inconnue. Wnt8a active la voie de la β -caténine dans la couche vitelline syncytiale dorsale (voir Section 3.2) et les blastomères marginaux dorsaux, dans les noyaux desquels la β -caténine s'accumule (Fig. 4.38). Des antagonistes maternels de Wnt permettent aussi de limiter la signalisation Wnt au futur côté dorsal.

La couche vitelline syncytiale dorsale et les blastomères marginaux qui la recouvrent, constitueront la future région de l'écusson (voir Section 3.2). Cette couche peut être considérée comme l'équivalent du centre de Nieuwkoop et les blastomères comme l'équivalent de l'organisateur de Spemann. Les embryons de poisson-zèbre, comme ceux de xénope, passent par une phase de transition blastuléeenne à partir de laquelle débutent les transcriptions zygotiques. Celle-ci se produit au stade 512 cellules, en même temps que la formation de la couche syncytiale à la lisière entre le blastoderme et le vitellus. Peu après, la β -caténine participe à l'activation de l'expression d'un gène zygotique codant un facteur de transcription, Dharma, qui est indispensable pour induire la fonction organisatrice de l'écusson et le développement des régions de la tête et du tronc (voir Fig. 4.38).

4.19 Les feuillets embryonnaires sont spécifiés dans le blastoderme du poisson-zèbre par des signaux similaires de ceux du xénope

Au cours du passage entre blastula et gastrula, on observe dans l'embryon du poisson-zèbre un brassage cellulaire important rendant impossible l'établissement d'une

Fig. 4.38 Comparaison de la mise en Iplace de l'organisateur dorsal entre les embryons de xénope et de poisson-zèbre.

À gauche : chez le xénope, la rotation corticale entraîne les déterminants dorsaux tels que les ARNm wnt11 et wnt5a (en vert) vers la future région dorsale de l'embryon, créant une large région où, à partir du stade 32 cellules, la β -caténine se déplace du cytoplasme vers le noyau (en rouge). Les cellules où la β-caténine a pénétré dans le noyau et où VegT est également présent, produisent le facteur de transcription Siamois, et constituent le centre de Nieuwkoop dans la région végétative dorsale de la blastula (coloration bleue). L'organisateur dorsal de Spemann se mettra en place dans la région équatoriale placée au-dessus du centre de Nieuwkoop chez la jeune gastrula. À droite : chez le poisson-zèbre, le déterminant dorsal, l'ARNm wnt8a, est transporté vers le futur côté dorsal de l'embryon par l'intermédiaire de microtubules agencés en rangées parallèles et pénètre dans le blastoderme. Lors de la transition blastuléenne, la β-caténine pénètre dans les noyaux du syncytium vitellin dorsal où elle induit la production du facteur de transcription Dharma (coloration bleue). La région de l'écusson, l'organisateur chez le poissonzèbre, apparaîtra dans la région dorsale à partir des blastomères recouvrant marginaux.





Fig. 4.39 Carte des territoires présomptifs du poisson-zèbre au stade jeune gastrula. Les trois feuillets embryonnaires proviennent du blastoderme qui repose sur l'hémisphère inférieur constitué par une cellule vitelline non divisée. Le futur endoderme provient des marges dorsale et latérale du blastoderme qui donneront également naissance à du

mésoderme (endomésoderme), et qui ont commencé à pénétrer en interne. Les cellules de la région équatoriale donnent naissance au mésoderme et l'ectoderme a pour origine les cellules les plus proches du pôle animal. carte reproductible des territoires présomptifs lors du clivage, carte qui ne pourra être élaborée qu'à partir du stade gastrula précoce. Chez le poisson-zèbre, ce dernier stade comporte un blastoderme de cellules profondes, recouvert d'une mince couche cellulaire enveloppante, en grande partie protectrice et qui est finalement éliminée (Fig. 3.11). Au début de la gastrulation, le devenir des cellules de la couche profonde, dont seront issues toutes les cellules de l'embryon, est corrélé avec leur position par rapport au pôle animal. Les cellules les plus proches de celui-ci forment l'ectoderme, alors que les cellules situées en dessous d'elles, légèrement plus éloignées du pôle animal, sont à l'origine du mésoderme et que les cellules dorsales et latérales marginales du blastoderme constituent une couche d'**endomésoderme** située au sommet du vitellus (voir Fig. 4.39). Des cellules endodermiques et mésodermiques se différencieront au sein de l'endomésoderme avant de se séparer. De façon générale, la carte des territoires présomptifs du poisson-zèbre est assez similaire de celle du xénope, si on imagine la région végétative du xénope à un stade blastula âgée remplacée par une seule grande cellule vitelline.

Des expériences dans lesquelles des cellules isolées marquées sont transplantées depuis une gastrula dans un embryon à un stade plus tardif montrent que beaucoup de cellules ne sont pas encore spécifiées ou déterminées (voir Section 1.12 et Fig. 1.22) et que leur potentiel de développement est plus grand que ce que la carte des territoires présomptifs suggère. Ceci signifie que le devenir véritable d'une cellule du blastoderme dépend d'interactions cellulaires. Comme chez le xénope, le feuillet embryonnaire mésodermique du poisson-zèbre n'est pas pré-spécifié et l'induction du mésoderme, qui implique justement des interactions intercellulaires, est l'un des événements clé du développement précoce. Des criblages de mutagenèse ont identifié chez le poisson-zèbre des gènes similaires de ceux impliqués dans l'induction mésodermique et la mise en place du patron dorsoventral du xénope. Ils confirment les grandes lignes de la spécification des feuillets embryonnaires. La protéine de signalisation du poisson-zèbre Squint, apparentée à Nodal, est exprimée dans la couche syncytiale vitelline et dans les cellules situées juste au-dessus d'elle. Squint et une autre protéine apparentée à Nodal, Cyclops, sont requises pour la spécification des blastomères marginaux en futur endoderme et mésoderme. Une signalisation Nodal très active spécifiera le futur endoderme et des niveaux plus bas le mésoderme. Un antagoniste de Nodal est également produit et permet d'éviter l'activité de la signalisation Nodal dans la région du blastoderme qui formera le futur ectoderme (Fig. 4.40).

Des doubles mutants de Squint et Cyclops sont dépourvus de mésoderme céphalique et troncal, mais un peu de mésoderme se développe au niveau de la queue.

La signalisation Nodal fait intervenir Smad2 (voir Encart 4C) dont l'accumulation dans le noyau et le complexe qu'il forme avec Smad4 ont été visualisés dans des embryons de poissons-zèbres transgéniques porteurs d'un gène Smad2 fusionné avec une séquence codant un marqueur fluorescent. Cette expérience révèle une gamme d'intensité de signalisation du type Nodal, très probablement due à Squint, dans le blastoderme de ces embryons, avec l'activité la plus élevée à la lisière du blastoderme et qui s'amenuise vers le pôle animal. Ceci confirme qu'il existe un gradient de signalisation Nodal qui pourrait fournir aux cellules du blastoderme une information de position. Cette signalisation semble aussi la plus forte et la plus durable dans la région marginale dorsale du blastoderme, suggérant qu'elle puisse également intervenir dans la mise en place du patron dorso-ventral du mésoderme. L'injection d'ARNm squint dans une cellule d'un jeune embryon de poisson-zèbre provoque l'activation de gènes cibles de Squint à seuil élevé dans les cellules voisines, alors que des gènes à seuil bas sont activés dans des cellules plus éloignées. Cela correspondrait à une action de Squint en tant que morphogène, allumant des gènes mésodermiques différents en fonction de seuils de concentration (comparer avec la Fig. 4.22).

Brachyury est l'un des marqueurs les plus précoces du mésoderme. Des mutants de poisson-zèbre appelés *no tail*, dépourvus de queue, ont été isolés et il a été montré que la mutation affectait le gène *brachyury*. Utilisant les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage de l'ADN (ChIP-seq, voir Fig. 3.41), il a été montré que *no tail* active un réseau de gènes codant des facteurs de transcription et des molécules de signalisation impliqués dans la mise en place du patron du mésoderme et de sa différenciation.

4.20 L'écusson du poisson-zèbre est l'organisateur embryonnaire comme celui de Spemann chez le xénope

L'écusson du poisson-zèbre possède une fonction organisatrice similaire à celle de l'organisateur de Spemann chez le xénope et peut induire un axe corporel complet s'il est transplanté dans un autre embryon d'âge approprié. Ceci montre que l'écusson est capable d'organiser et de coordonner à la fois les dimensions dorso-ventrale et antéropostérieure du plan corporel, et également d'induire du tissu neural à partir de l'ectoderme (Fig. 4.41). Beaucoup des protéines impliquées dans la mise en place du patron dorso-ventral des feuillets embryonnaires chez le poisson-zèbre sont homologues de celles intervenant chez le xénope, tels que Chordin et les BMPs.

Chez le xénope, le pouvoir inducteur de l'organisateur de Spemann se modifie avec le temps tandis que des populations cellulaires différentes se succèdent au niveau de la

Fig. 4.41 La transplantation d'un écusson peut induire un nouvel axe corporel chez le poisson-zèbre. La région de l'écusson provenant de la région dorsale d'un embryon au stade gastrula, dont toutes les cellules ont été marquées par du dextrane-amine lié à la fluorescéine, est transplantée dans la région ventrale d'un embryon de même stade. Le transplant induit un second axe complet avec une tête, un cerveau et un cœur à partir du tissu de l'hôte. Les cellules transplantées sont à l'origine chez l'embryon surnuméraire de la plaque préchordale, de la chorde ainsi que de la glande d'éclosion (hg pour *hatching gland*).

D'après Saude, L. et al. : **Axis-inducing activities and cell fates of the zebrafish organizer**. Development 2000 **127**, 3407-3417.



Fig. 4.40 Spécification de l'endoderme et du mésoderme dans le blastoderme du poisson-zèbre. Des molécules de signalisation proches de Nodal, Squint et Cyclops, sont sécrétées par des cellules marginales du blastoderme et diffusent dans ce dernier, générant un gradient de signalisation Nodal. Le niveau élevé de celle-ci près de la marge du blastoderme spécifie un endomésoderme, à partir duquel se formeront endoderme et mésoderme, tandis que le niveau réduit du signal Nodal dans la zone plus éloignée de la marge spécifie du mésoderme. La zone d'activité de Squint est large, contrairement à celle de Cyclops, plus restreinte. Lefty, un inhibiteur de la signalisation Nodal, est aussi sécrété par les cellules marginales du blastoderme et diffuse dans celui-ci. Lefty présente une zone d'activité large et limite la portée de la signalisation Nodal, assurant que les cellules ectodermiques n'y sont pas exposées.

D'après Schier, A.E.; **Nodal morphogens.** Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2009 ; 1:a003459.



Fig. 4.42. La future moelle épinière de l'embryon du poisson-zèbre est éloignée de l'organisateur. Chez la gastrula âgée, l'ectoderme à partir duquel se formera la moelle épinière est situé au niveau de l'ectoderme ventral, du côté opposé à celui de l'organisateur, et est trop éloigné de lui pour être sous l'influence de ses signaux. Les signaux FGF dans la région ventrale induisent l'ectoderme en futur tissu neural et les BMP promeuvent son développement en un type neural postérieur (moelle épinière). Pour simplifier, l'épiderme de l'embryon d'un jour qui, à ce stade, recouvre l'embryon dans son entier, n'est pas représenté.

Illustration d'après Kudoh, T., et al. : Combinatorial Fgf and Bmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains. Development 2004, **131 :** 3581-3592.



lèvre dorsale du blastopore au cours de la gastrulation. À des stades équivalents chez le poisson-zèbre, la totalité de la bordure de la gastrula suivant l'axe dorso-ventral possède une activité organisatrice, la région dorsale de l'écusson pouvant induire deux embryons jumeaux ayant des axes antéro-postérieurs complets (voir Fig. 4.41), et des régions progressivement plus ventrales induisant des axes supplémentaires constitués de structures de plus en plus postérieures. Des différences quantitatives de signalisation sont impliquées dans la spécification de l'axe antéro-postérieur, la tête étant induite par la partie dorsale de l'écusson, là où les signalisations de Nodal, BMP et Wnt sont à un niveau faible, et la queue étant induite par la partie ventrale de la gastrula où ces mêmes signalisations sont fortes. Ces gradients de signalisation résultent de la sécrétion d'antagonistes par la région de l'écusson. La nécessité d'une inhibition de la signalisation Wnt pour la formation de la tête est confirmée par une mutation du gène du facteur de transcription TCF3 (pour *T-cell-specific factor 3*). TCF3 réprime les gènes cibles de Wnt quand la voie est inactive (voir Encart 4B). Quand TCF3 est muté, l'activité de Wnt augmente et le mutant ne possède plus de tête ; pour cette raison, la mutation a été appelée *headless*.

Chez le poisson-zèbre, l'induction du neuroectoderme postérieur, qui est à l'origine de la moelle épinière, semble être le fait de la signalisation FGF indépendamment de l'inhibition de la signalisation BMP. La région de l'écusson contribue à l'induction du tissu antérieur neural en inhibant la signalisation BMP, comme le fait l'organisateur chez le xénope, mais l'ectoderme qui donnera la moelle épinière est à une certaine distance de l'organisateur, sur le côté ventral-végétatif de l'embryon du poisson-zèbre, là où les signaux de l'organisateur ne peuvent pas l'atteindre (Fig. 4.42). L'initiateur du développement neural dans l'ectoderme végétatif ventral est le FGF, et les signaux BMP, qui sont élevés dans la région ventrale, apparaissent ici entraîner l'ectoderme neural vers un devenir postérieur.

Résumé du Chapitre 4

- Le xénope et le poisson-zèbre ont tous les deux le même plan corporel de base. Au cours du développement précoce, les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont mis en place. Chez le xénope et le poisson-zèbre, cette mise en place implique des déterminants maternels localisés et des interactions intercellulaires.
- Il est possible d'établir dans le jeune embryon une carte des territoires présomptifs concernant les trois feuillets embryonnaires, le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Les cartes relatives au xénope et au poisson-zèbre sont très similaires, les différences principales étant liées à la quantité de vitellus dans l'œuf qui affecte les divisions de segmentation et la manière dont se forme l'endoderme chez le poisson-zèbre.
- À des stades précoces du développement, les embryons sont encore capables d'une grande régulation et ceci souligne le rôle crucial joué par les interactions intercellulaires durant le développement.
- Chez le xénope, les signaux émanant des différentes régions de la blastula sont impliqués dans l'induction du mésoderme. De bons candidats pour ces signaux ont été identifiés qui incluent des membres de la famille des TGF-β, en particulier Nodal, et des protéines Wnt.

- Pour certaines concentrations, ces signaux activent des gènes mésoderme-spécifiques tel que brachyury, et ces signaux sous la forme de gradients, peuvent établir des profils mésodermiques. L'expression mésodermique de brachyury est maintenue par la signalisation FGF qui aide également à la mise place du patron du mésoderme.
- L'induction du mésoderme implique des protéines pour la plupart identiques chez le xénope et le poisson-zèbre.
- L'organisation des trois feuillets embryonnaires le long de l'axe dorso-ventral, comme l'établissement de l'axe antéro-postérieur et l'induction neurale durant la gastrulation, sont sous la dépendance de signaux issus de l'organisateur de Spemann chez le xénope et de la région de l'écusson chez le poisson-zèbre.
- Greffé sur la face ventrale d'une jeune gastrula de xénope, l'organisateur de Spemann induit un second axe corporel possédant une tête et un axe dorso-ventral complet, et des embryons siamois se développent. L'écusson peut de manière semblable induire la formation d'un embryon surnuméraire possédant son propre axe corporel.
- Les organisateurs sécrètent des facteurs de croissance antagonistes, qui instaurent des gradients de signalisation TGF-β et Wnt mettant en place l'organisation de l'embryon.
- La signalisation BMP sous forme d'un gradient fournit une information de position pour l'organisation dorso-ventrale du mésoderme, avec des teneurs élevées et basses en BMP spécifiant, respectivement, des tissus dorsaux tels que les somites et des tissus ventraux tels les éléments sanguins.
- La tête se forme là où les signaux Nodal, BMP et Wnt sont peu élevés. La queue se formant à l'inverse, là où les signalisations BMP et Wnt sont fortes.
- La spécification et le profil structural de la plaque neurale, à l'origine du système nerveux, dépendent de signaux issus de l'organisateur et du mésoderme qui se dispose sous la plaque neurale présomptive de nature ectodermique durant la gastrulation.
- L'inhibition de la signalisation BMP par des protéines telles que Noggin produite par l'organisateur est requise pour l'induction neurale.
- La mise en place du patron de la plaque neurale implique à la fois des différences quantitative et qualitative dans les signaux en provenance du mésoderme, des niveaux élevés de Wnt et de la signalisation FGF spécifiant les structures les plus postérieures.
- La mise en place du plan corporel est réalisée de façon très similaire chez le xénope et le poisson-zèbre. Ceci indique que les mécanismes du développement ont probablement été très conservés chez tous les vertébrés. Cette question sera abordée plus en détail dans le Chapitre 5 où la mise en place du plan d'organisation sera étudiée chez les embryons de poulet et de la souris.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. L'organisation de l'embryon de xénope débute avec l'établissement de l'axe dorso-ventral. Un élément important relié à cet événement est l'accumulation de β -caténine dans les cellules de la zone marginale dorsale. Décrire la succession d'événements conduisant à cette accumulation. Inclure le dépôt maternel de facteurs dans l'ovocyte, les événements qui accompagnent l'entrée du spermatozoïde, la rotation corticale et la voie de signalisation Wnt.

2. Donner une explication moléculaire pour les effets ventralisant d'une irradiation de l'œuf aux UV et d'un traitement au lithium de l'embryon.

3. Le centre de Nieuwkoop a été caractérisé par des expériences variées chez le xénope. Décrire les résultats des expériences suivantes:

- (a) Les deux cellules dorsales d'un embryon au stade quatre cellules sont séparées des deux cellules ventrales. Sous quelle forme chaque moitié d'embryon se développe-t-elle ?
- (b) Des cellules de la région animale d'une blastula âgée sont cultivées en présence de cellules issues de la région dorso-végétative.

(c) Des cellules de la région dorso-végétative d'un embryon au stade 32 cellules sont greffées dans la partie ventrale d'un embryon au même stade.

4. Quel est le résultat de l'expérience suivante ? La lèvre dorsale du blastopore d'une jeune gastrula de xénope est greffée dans la zone marginale ventrale d'une autre jeune gastrula (voir aussi Section 1.4). Quelle est l'explication de ce résultat ?

5. Revoir ce qui a été appris au sujet de la spécification mésodermique la plus antérieure chez une gastrula de xénope en incluant l'activation de *goosecoïd* en réponse à une signalisation de la famille des TGF- β . Quel est le rôle de ce mésoderme lors de la suite du développement ?

6. Le modèle de l'induction neurale par défaut, chez le xénope, propose que le développement de l'ectoderme dorsal en tissu neural soit la voie par défaut. Quelle preuve étaye ce modèle et quelle en est la base moléculaire ? Comment ce modèle a-t-il été modifié à la lumière de travaux plus récents ? Inclure la signalisation FGF dans la réponse.

7. Décrire les rôles dans le développement embryonnaire du xénope de la protéine VegT présente dans les œufs fécondés et les embryons précoces. Inclure dans la réponse la nature de cette protéine ;

Gène	Maternel/ zygotique	Type de protéine	Site d'expression	Fonction du produit
Spécification des feuillets	embryonnaire	es et de l'axe dorso-ventral		
vegt	М	Facteur de transcription	Région végétative	Spécification endodermique; activation de l'expression des inducteurs mésodermique
ectodermin (thim33)	Μ	Ubiquitine ligase	Hémisphère animal	Spécification ectodermique; inhibition de la formation du mésoderme
vg1	Μ	Famille TGF- β	Région végétative; ARN concentré dorsalement aprèc la fécondation	Induction du mésoderme
wnt11	Μ	Famille Wnt	Région végétative; translocationde l'ARN côté	Spécification des structures dorsales et formation de l'organisateur
dishevelled	М	Protéine de la voie de signalisation Wnt	dorsal après la fécondation Protéine associée à des vésicules se déplaçant du côté dorsal de l'embryon après la fécondation	Spécification des structures dorsales et formation de l'organisateur
eta-catenin (ctnnb1)	Μ	Intervient dans la voie Wnt; régule l'expression	Protéine concentrée dans les noyaux dorsaux suite à la signalisation Wat	Spécification des structures dorsales et formation de l'organisateur
gsk3β	Μ	Protéine kinase	Protéine exclue du côté	Suppression des signaux dorsalisant
axin	Μ	se lie à la β -caténine	ARN dans l'ensemble du zygote; protéine plus présente	Suppression des signaux dorsalisant
dickkopf1 (dkk1)	Μ	Protéine sécrétée	Région ventrale	Limitation de la signalisation Wnt à la région dorsale
Foxl1e (foxi1)	Z	Facteur de transcription	Hémisphère animal	Maintien des cellules ectodermiques
derrière	Z	Famille TGF- β	Hémisphère végétatif et	Induction du mésoderme postérieur
nodal related-1,2,4,5,6	Ζ	Famille TGF- $m{eta}$	Hémisphère végétatif et zone marginale; concentration	Induction du mésoderme
fgf (plusieurs types)	Z	Protéines signal sécrétées	Hémisphère végétatif et zone marginale	Développement du mésoderme postérieu
Mise en place du patron				
brachyury	Z	Facteur de transcription	Ensemble du futur mésoderme	Formation du mésoderme postérieur
wnt8	Z	Famille Wnt	Régions ventrale et latérale	Ventralisation mésodermique
bmp4	Z	Famille TGF- β	Ensemble de la blastula âgée, puis exclusion depuis	Ventralisation mésodermique
activin	Z	Famille TGF- β	Ensemble de la blastula âgée/ jeune gastrula	Induction et organisation du mésoderme
Fonction d'organisateur	_	_		
siamois noggin	Z Z	Facteur de transcription Protéine signal sécrétée	Centre de Nieuwkoop Organisateur de Spemann	Induction de l'organisateur Dorsalisation mésodermique <i>via</i> une
chordin	Z	Protéine signal sécrétée	Organisateur de Spemann	activite antagoniste envers BMP-4 Dorsalisation mésodermique <i>via</i> une
frzb	Z	Protéine signal sécrétée	Organisateur de Spemann	Dorsalisation mésodermique via une
cerberus-like	Z	Protéine signal sécrétée	Organisateur de Spemann	Promotion du développement céphaliqu par inhibition des signalisations Wnt, Nodal-related et BMP
follistatin	Z	Protéine sécrétée	Organisateur de Spemann	Antagoniste de BMP
goosecola lim1	∠ 7	Facteur de transcription Facteur de transcription	Organisateur de Spemann Organisateur de Spemann	Fonction de l'organisateur Gastrulation et formation de la tête
otx2	Z	Facteur de transcription	Organisateur de Spemann	Formation des structures antérieures
not	Z	Facteur de transcription	Organisateur de Spemann	Spécification de la chorde

RÉSUMÉ : Principaux gènes impliqués dans la mise en place des axes et des feuillets embryonnaires chez le xénope

si elle est d'origine maternelle ou si elle est transcrite et traduite à partir des propres gènes de l'embryon ; sa localisation dans l'œuf fécondé ; les feuillets embryonnaires dans la spécification desquels elle est impliquée, soit seule soit combinée avec d'autres protéines.

8. Une vue simplifiée de la gastrulation du xénope serait de représenter la blastula comme une balle souple, et l'involution des cellules au cours de la gastrulation assimilable au fait d'enfoncer les doigts dans la balle à un endroit correspondant au blastopore, jusqu'à toucher la surface opposée ventrale. Examiner la carte des territoires présomptifs de l'embryon de xénope (Fig. 4.9) ; pourquoi cette vision simplifiée est-elle fausse ? Apporter une description plus précise du processus (se référer pour s'aider à la Fig. 3.6). Où le mésoderme devrait-il être localisé dans la blastula pour que la seule invagination puisse suffire.

9. Spécification, détermination et différenciation décrivent différents états d'évolution d'une cellule. Définir chacun de ces termes et décrire quelles expériences sont utilisées pour distinguer chacun de ces différents stades évolutifs (se référer aux Sections 1.12 et 4.5 pour la réponse). Imaginer quels types de modifications peuvent s'opérer dans la cellule à un niveau moléculaire entre la spécification et la détermination.

10. Le développement précoce d'un amphibien est, jusqu'à la transition blastuléenne, grandement dépendant de facteurs fournis par la mère. Qu'est-ce que la transition blastuléenne ? Quel est le modèle pour expliquer ce qui se produit ? Quelle preuve expérimentale conforte ce modèle ?

11. Le tissu dorso-végétatif contenant le centre de Nieuwport induit la chorde et les muscles à partir des cellules de la coiffe animale, alors que le tissu végétatif ventral induit essentiellement des tissus sanguins et un peu de muscles (Section 4.9). Quelle est la signification de ces observations ? Quels types de signalisation sont requis pour expliquer ces observations ?

12. Un événement précoce concernant la formation d'un axe est l'accumulation du facteur de transcription β -caténine dans les noyaux au niveau de l'un des côtés de l'embryon de xénope. Quel côté est spécifié ? Décrire brièvement comment les actions de la β -caténine conduisent à la spécification de l'organisateur de Spemann.

13. Quelle est la fonction du membre de la famille des TGF- β , BMP-4, dans la gastrula précoce ? Alors que BMP-4 est initialement présente dans l'ensemble de l'embryon, pourquoi ses effets sont-ils restreints à des régions particulières (a) de l'ectoderme, et (b) dans le mésoderme dorsal ?

14. La voie de signalisation TGF- β est un remarquable exemple de la conservation des voies de signalisation durant l'évolution. Comparer les activités de BMP-4 dans le xénope et Decapentaplegic chez la drosophile. Décrire comment un gradient de la signalisation BMP est établi dans la gastrula de xénope. Jusqu'à quel niveau ce mécanisme est-il conservé chez la drosophile ?

15. Les embryons de poissons-zèbres sont de bons modèles pour l'analyse génétique du développement. Quels mutants de poisson-zèbre ont fourni des idées pour la mise en place du plan corporel des vertébrés ?

16. En quoi l'activité de la région de l'écusson du poisson-zèbre estelle comparable à celle de l'organisateur de Spemann de l'embryon d'amphibien ?

QCM

NB Il n'y a qu'une seule réponse correcte à chaque question

- 1. Le système nerveux, le cœur, et le foie dérivent respectivement
- de _____, ____, et _____ a) sont tous dérivés du mésoderme
- b) ectoderme, mésoderme et endoderme
- c) endoderme, mésoderme et ectoderme
- d) mésoderme, ectoderme et endoderme
- **2.** L'« organisateur » chez le xénope est responsable
- a) d'une induction mésodermique dans les cellules voisines
- b) d'une contribution à la mise en place du patron mésodermique le long de l'axe dorso-ventral
- c) d'une spécification de la région dorsale de l'embryon
- d) de tous les événements cités précédemment

3. Le facteur clé qui spécifie l'organisateur des embryons de xénope est :

- a) GSK-3B
- b) Fz7
- c) Wnt-11
- d) β-caténine

4. Si des cellules provenant du pôle animal d'une blastula de xénope, c'est-à-dire des cellules de la coiffe animale, sont mises en contact direct avec des cellules de la région végétative, quelles en sont les conséquences ?

- a) Un embryon se forme avec seulement des dérivés ectodermiques et endodermiques.
- b) Les cellules de la coiffe animale sont induites par les cellules végétatives à former des dérivés mésodermiques.
- c) Une régulation se produit et se forme un embryon normal.
- d) Les cellules de l'hémisphère végétatif sont induites par les cellules de la coiffe animale à former des dérivés mésodermiques.
- 5. Les facteurs maternels sont
- a) les réserves énergétiques vitellines présentes dans les œufs de nombreuses espèces
- b) le lot haploïde de gènes maternels contribuant au génome de l'embryon
- c) les gènes exprimés par le génome zygotique
- d) les ARNm et les protéines actifs durant le développement stockés dans l'ovule par la mère
- 6. L'activité de la protéine Chordin est
- a) d'être antagoniste de la signalisation BMP et de bloquer la ventralisation du mésoderme.
- b) d'être un signal *via* la voie Chordin et de mettre en place l'organisateur.
- c) de spécifier un devenir mésodermique.
- d) de faire exprimer les gènes qui provoquent la détermination des cellules les plus antérieures de l'embryon qui formeront la tête.

7. Vg-1, Nodal, BMP et activine sont tous des membres de quelle famille de molécules de signalisation ?

- a) FGF
- b) Hedgehog
- c) TGF- β
- d) Wnt

8. Dans une jeune blastula, la signalisation Wnt et l'accumulation nucléaire de β -caténine qui s'ensuit spécifie une destinée dorsale, alors qu'après la gastrulation, la signalisation Wnt/ β -caténine spécifie

- a) une destinée dorsale
- b) une destinée postérieure
- c) une destinée antérieure
- d) toutes les destinées citées ci-dessus
- 9. La protéine Brachyury est
- a) un marqueur précoce mésodermique
- b) un marqueur précoce de l'endoderme
- c) exprimée dans l'ensemble de l'ectoderme
- d) seulement exprimée après la gastrulation

10. L'endoderme et le mésoderme sont spécifiés dans le blastoderme du poisson-zèbre par

- a) des signaux provenant de l'écusson
- b) des molécules maternelles de signalisation déposées dans l'œuf
- c) un gradient de la signalisation β -caténine
- d) un gradient de la signalisation Nodal

Réponses aux QCM

1 : b, 2 : b, 3 : d, 4 : b, 5 : d, 6 : a, 7 : c, 8 : b, 9 : a, 10 : d.

Références bibliographiques

4.1 L'axe pôle animal-pôle végétatif est déterminé maternellement chez le xénope

- Heasman, J. : Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* 2006, **133** : 1205–1217.
- Weaver, C., Kimelman, D. : Move it or lose it : axis specification in *Xenopus*. *Development* 2004, **131** : 3491–3499.

ENCART 4B La voie de signalisation Wnt/β-caténine

- Logan, C.Y., Nusse, R. : The **Wnt signalling pathway in** development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004, 20 : 781–801.
- Nusse, R., Varmus, H. : Three decades of Wnts : a personal perspective on how a scientific field develops. *EMBO J.* 2012, **31 :** 2670–2684.

4.2 L'activation locale de la signalisation Wnt/β-caténine spécifie le futur côté dorsal de l'embryon

- Cha, S.W., Tadjuidje, E., Tao, Q., Wylie, C., Heasman, J. : Wnt 5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in *Xenopus* axis formation. *Development* 2008, 135 : 3719–3729.
- Cha, S.W., Tadjuidje, E., White, J., Wells, J., Mayhew, C., Wylie, C., Heasman, J. : Wnt 11/5a complex formation caused by tyrosine sulfation increases canonical signaling activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009, 19 : 1573–1580.
- Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Browning,
 B., Stewart, R. : Cortical rotation of the *Xenopus* egg :
 consequences for the antero-posterior pattern of embryonic
 dorsal development. *Development* (Suppl.) 1989, 37–51.
- Heasman, J. : Maternal determinants of embryonic cell fate. Semin. Cell Dev. Biol. 2006, 17 : 93–98.

4.3 Des centres de signalisation se développent du côté dorsal de la blastula

Glimich, R.L., Gerhart, J.C. : Early cell interactions promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. Dev Biol 1984, 104 : 117–130.

- Kodjabachian, L., Lemaire, P. : Embryonic induction : is the Nieuwkoop centre a useful concept ? Curr Biol. 1998, 8 : R918–921.
- Nieuwkoop, P.D. : **The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. I. Induction by the endoderm.** *Wilhelm Roux Arc. EntwMech.Org.* 1969, **162** : 341–373.
- Vonica, A., Gumbiner, B.M. : The Xenopus Nieuwkoop center and Spemann-Mangold organizer share molecular components and a requirement for maternal Wnt activity. Dev. Biol. 2007, 312 : 90–102.

4.4 La carte des territoires présomptifs de la blastula de xénope rend compte du rôle de la gastrulation

- Dale, L., Slack, J.M.W. : Fate map for the 32 cell stage of *Xenopus laevis*. *Development* 1987, 99 : 527–551.
- Gerhart J. : Changing the axis changes the perspective. *Dev. Dyn.* 2002, **225** : 380–383.

4.5 L'absence de détermination des cellules de l'embryon précoce de xénope rend possible une régulation

Snape, A., Wylie, C.C., Smith, J.C., Heasman, J. : Changes in states of commitment of single animal pole blastomeres of *Xenopus laevis*. Dev. Biol. 1987, 119 : 503–510.

Wylie, C.C., Snape, A., Heasman, J., Smith, J.C. : Vegetal pole cells and commitment to form endoderm in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 1987, 119 : 496–502.

ENCART 4C La voie de signalisation TGF- β

- Massagué, J. : How cells read TGF- β signals. Nat Rev. Mol. Cell Biol. 2000, 1 : 169–178.
- Schier, A.F. : Nodal signals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009, 1 : a003459.
- Schier, A.F. : Nodal signaling in vertebrate development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2003, **19 :** 589–621.

4.6 L'endoderme et l'ectoderme sont spécifiés par des facteurs maternels, tandis que le mésoderme est induit à partir de l'ectoderme par des signaux provenant de la région végétative

&

4.7 L'induction du mésoderme survient au cours d'une période restreinte du stade blastula

- Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., Adorno, M., Rugge, M., Piccolo, S. : Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 2005, **121** : 87–99.
- Gurdon, J.B., Lemaire, P., Kato, K. : **Community effects and** related phenomena in development. *Cell* 1993, **75** : 831–834.
- Mir, A., Kofron, M., Zorn, A.M., Bajzer, M., Haque, M., Heasman, J., Wylie, C.C. : FoxI1e activates ectoderm formation and controls cell position in the *Xenopus* blastula. *Development* 2007, 134 : 779–788.
- White, J.A., Heasman, J. : Maternal control of pattern formation in *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool. B 2008, **310** : 73–84.
- Xanthos, J.B., Kofron, M., Wylie, C., Heasman, J. : Maternal VegT is the initiator of a molecular network specifying endoderm in *Xenopus laevis*. *Development* 2001, **128** : 167–180.

4.8 L'expression des gènes zygotiques débute à la transition blatuléenne

Yasuda, G.K., Schübiger, G. : **Temporal regulation in the early embryo : is MBT too good to be true ?** *Trends Genet.* 1992, **8 :** 124–127.

4.9 Les signaux d'induction du mésoderme et du plan primaire d'organisation sont produits par la région végétative, le centre organisateur, et le mésoderme ventral

Agius, E., Oelgeschläger, M., Wessely, O., Kemp, C., De Robertis, E.M. : Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* 2000, **127** : 1173–1183.

Heasman, J. : **Patterning the early** *Xenopus* **embryo**. *Development* 2006, **133** : 1205–1217.

Kimelman, D. : Mesoderm induction : from caps to chips. *Nat. Rev. Genet.* 2006, **7 :** 360–372.

4.10 Les protéines de la famille TGF- β sont des inducteurs du mésoderme

- Jones, C.M., Kuehn, M.R., Hogan, B.L., Smith, J.C., Wright, C.V. : Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* 1995, **121** : 3651–3662.
- Osada, S.I., Wright, C.V. : Xenopus nodal-related signaling is essential for mesendodermal patterning during early embryogenesis. *Development* 1999, **126** : 3229–3240.
- White R.J., Sun, B.I., Sive, H.L., Smith, J.C. : Direct and indirect regulation of derrière, a Xenopus mesoderm-inducing factor, by VegT. *Development* 2002, **129** : 4867–4876.

ENCART 4D Étude de la fonction d'un récepteur par l'utilisation de mutations dominantes négatives

Dyson, S., Gurdon, J.B. : Activin signalling has a necessary function in *Xenopus* early development. *Curr Biol.* 1997, 7 : 81–84.

4.11 L'expression zygotique des signaux d'induction du mésoderme et du plan d'organisation est activée par l'action combinée des facteurs maternels VegT et Wnt

De Robertis, E.M., Larrain, J., Oelgeschläger, M., Wessely, O. : **The** establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat Rev. Genet.* 2000, **1** : 171–181.

Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S-I., Wright, C., Wylie, C., Heasman, J. : **Mesoderm induction in** *Xenopus* **is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGF**β **growth factors**. *Development* 1999, **126** : 5759–5770.

Niehrs, C. : Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat. Rev. Genet.* 2004, **5**: 425–434.

4.12 Des seuils de réponse aux gradients de protéines de signalisation modèlent le mésoderme

- Fletcher, R.B., Harland, R.M. : The role of FGF signaling in the establishment and maintenance of mesodermal gene expression in *Xenopus*. Dev. Dyn. 2008, 237 : 1243–1254.
- Green, J.B.A., New, H.V., Smith, J.C. : **Responses of embryonic** *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell* 1992, **71** : 731–739.

- Gurdon, J.B., Standley, H., Dyson, S., Butler, K., Langon, T., Ryan, K., Stennard, F., Shimizu, K., Zorn, A. : **Single cells can sense their position in a morphogen gradient**. *Development* 1999, **126** : 5309–5317.
- Piepenburg, O., Grimmer, D., Williams, P.H., Smith, J.C. : Activin redux : specification of mesodermal pattern in *Xenopus* by graded concentrations of endogenous activin B. *Development* 2004, 131 : 4977–4986.

Saka, Y., Smith, J.C. A mechanism for the sharp transition of morphogen gradient interpretation in *Xenopus. BMC*, 2007, 7: 47.

Schulte-Merker, S., Smith, J.C. : Mesoderm formation in response to Brachyury requires FGF signalling. Curr. Biol. 1995, 5: 62–67.

ENCART 4E La voie de signalisation FGF

Dorey, K., Amaya, E ; **FGF signalling : diverse roles during early** vertebrate embryogenesis. *Development* 2010, **137 :** 3731–3742.

4.13 Des signaux issus du centre organisateur structurent le mésoderme dorso-ventral en bloquant les effets des signaux ventraux

- De Robertis, E.M. : **Spemann's organizer and the self-regulation** of embryonic fields. *Mech. Dev.* 2009, **126** : 925–941.
- De Robertis, E.M. : Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. Nature Mol. Cell Biol. Rev. 2006, 7: 296–302.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E.M. : Dorsoventral patterning in *Xenopus* : inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 1996, 86 : 589–598.
- Zimmerman, L.B., De Jesús-Escobar, J.M., Harland, R.M. : The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 1996, 86 : 599–606.

4.14 Émergence de l'axe antéro-postérieur de l'embryon au cours de la gastrulation

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, P., Blumenstock,
C., Niehrs, C. : Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998, 391 : 357–362.

Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C., Niehrs,
C. : Head induction by simultaneous repression of Bmp- and
Wnt-signalling in *Xenopus*. *Nature* 1997, 389 : 517–519.

Hikasa, H., Sokol, S.Y. : Wnt signaling in vertebrate axis specification. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013, 5 : a 007955.

Kiecker, C., Niehrs, C. : The role of prechordal mesendoderm in neural patterning. Curr. Opin. Neurobiol. 2001, 11: 27–33.

Niehrs, C. : Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat. Rev. Genet.* 2004, **5** : 425–434.

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., De Robertis, E.M. : **The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals**. *Nature* 1999, **397 :** 707–710.

4.15 La plaque neurale est induite à partir de l'ectoderme

De Robertis, E.M. : **Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos**. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, **4**: 296–302. De Robertis, E.M., Kuroda, H. : Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Dev. Biol.* 2004, **20** : 285–308.

Reversade, B., De Robertis, E.M. : **Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating embryonic field**. *Cell* 2005, **123 :** 1147–1160.

4.16 Le système nerveux est structuré par des signaux mésodermiques le long de l'axe antéro-postérieur

- Kiecker, C., Niehrs, C. : A morphogen gradient of Wnt/betacatenin signaling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. Development 2001, **128** : 4189–4201.
- Pera, E.M., Ikeda, A., Eivers, E., De Robertis, E.M. : Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev.* 2003, **17** : 3023–3028.
- Sasai, Y., De Robertis, E.M. : Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev. Biol.* 1997, **182**: 5–20.

4.18 Les axes corporels du poisson-zèbre sont établis par des déterminants maternels

- Dosch, R., Wagner, D.S., Mintzer. K.A., Runke, G., Wiemelt, A.P., Mullins, M.C. : Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition : mutants from the zebrafish
 I. Dev. Cell 2004, 6 : 771–780.
- Kodjabachian, L., Dawid, I.B., Toyama, R. : Gastrulation in zebrafish : what mutants teach us. Dev. Biol. 1999, 126 : 5309–5317.
- Langdon, Y.G., Mullins, M.C. : Maternal and zygotic control of zebrafish dorsoventral axial patterning. *Annu. Rev. Genet.* 2011, 45 : 357–377.
- Lu, F.I., Thisse, C., Thisse, B. : Identification and mechanism of regulation of the zebrafish dorsal determinant. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2011, 108 : 15876–15880.
- Pelegri, F. : Maternal factors in zebrafish development. *Dev. Dyn.* 2003, **228 :** 535–554.
- Schier, A.F., Talbot, W.S. : Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* 2005, **39 :** 561–613.
- Tran, L.D., Hino, H., Quach, H., Lim, S., Shindo, A., Mimori-Kiyosue, Y., Mione, M., Ueno, N., Winkler, C., Hibi, M., Sampath, K. : Dynamic microtubules at the vegetal cortex predict the embryonic axis in zebrafish. *Development* 2012, 139 : 3644–3652.

4.19 Les feuillets embryonnaires sont spécifiés dans le blastoderme du poisson-zèbre par des signaux similaires de ceux du xénope

Agathon, A., Thisse, C., Thisse, B. : **The molecular nature of the zebrafish tail organizer**. *Nature* 2003, **424** : 448–452.

- Griffin, K., Patient, R., Holder, N. : Analysis of FGF function in normal and *no tail* zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and tail. *Development* 1995, **121** : 2983–2994.
- Harvey, S.A., Smith, J.C. : Visualisation and quantification of morphogen gradient formation in the zebrafish. *PLoS Biol.* 2009, 7: e101.
- Kimmel, C.B., Warga, R.M., Schilling, T.F. : Origin and organization of the zebrafish fate map. Development 1990, 108 : 581–594.
- Morley, R.H., Lachanib, K., Keefe, D., Gilchrist, M.J., Flicek, P., Smith, J.C., Wardle, F.C. : A gene regulatory network directed by zebrafish No tail accounts for its roles in mesoderm formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009, **106** : 3829–3834.
- O'Boyle, S., Bree, R.T., McLoughlin, S., Grealy, M., Byrnes, L. : Identification of zygotic genes expressed at the midblastula transition in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 358 : 462–468.
- Schier, A.F. : Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001, **11 :** 393–404.

4.20 L'écusson du poisson-zèbre est l'organisateur homologue de celui de Spemann du xénope

Fauny, J.D., Thisse, B., Thisse, C. : The entire zebrafish blastulagastrula margin acts as an organizer dependent on the ratio of Nodal to BMP activity. *Development* 2009, **136** : 3811–3819.

- Gonzalez, E.M., Fekany-Lee, K., Carmany-Rampey, A., Erter, C., Topczewski, J., Wright, C.V., Solnica-Krezel, L. : Head and trunk in zebrafish arise via coinhibition of BMP signaling by bozozok and chordino. *Genes Dev.* 2000, 14 : 3087–3092.
- Kudoh, T., Concha, M.L., Houart, C., Dawid, I.B., Wilson, S.W.:
 Combinatorial Fgf and Bmp signalling patterns the gastrula ectoderm into prospective neural and epidermal domains. Development 2004, 131 : 3581–3592.
- Londin, E.R., Niemiec, J., Sirotkin, H.I. : Chordin, FGF signaling, and mesodermal factors cooperate in zebrafish neural induction. Dev. Biol. 2005, 279 : 1–19.
- Saúde, L., Woolley, K., Martin, P., Driever, W., Stemple, D.L. : Axis-inducing activities and cell fates of the zebrafish organizer. Development 2000, 127 : 3407–3417.

5

Développement des vertébrés III : achèvement du plan d'organisation corporel du poulet et de la souris

- Mise en place du plan corporel du poulet et de la souris
- Formation des somites et mise en place de
- l'organisation antéropostérieure
- Origine des crêtes neurales et leurs devenirs respectifs
- Détermination de l'asymétrie gauche-droite

Dans ce chapitre seront étudiés plus en détail quelques aspects du développement des vertébrés marquant l'achèvement de leur organisation corporelle tels que la mise en place des somites, la régionalisation corporelle le long de l'axe antéro-postérieur, l'apparition et le devenir des cellules des crêtes neurales, et l'établissement de l'asymétrie gauche-droite du corps. Dans un premier temps, une description du développement précoce des embryons de poulet et de souris fera l'objet d'une comparaison avec celui concernant le xénope. La plupart des mécanismes de mise en place de l'organisation corporelle chez les oiseaux et les mammifères suivent les mêmes principes que ceux relatifs aux poissons et aux amphibiens ; les cartes des territoires présomptifs établies à des stades équivalents juste avant la gastrulation montrent de fortes similitudes et les gènes impliqués dans la spécification des feuillets embryonnaires sont semblables. Cependant il existe de profondes différences dans le développement précoce entre oiseaux, mammifères et amphibiens et celles-ci feront l'objet de la première partie du chapitre. Le poulet et la souris seront ensuite utilisés comme espèces modèles pour examiner en détail la formation des somites, la régionalisation et le modelage de l'embryon suivant l'axe antéro-postérieur par les gènes Hox, la formation des crêtes neurales aux multiples devenirs et la mise en place de l'asymétrie gauche-droite.

Dans ce chapitre seront examinés les mécanismes qui régissent l'agencement corporel terminal des vertébrés, en prenant comme organismes modèles principaux le poulet et la souris. Comme il est mentionné dans le Chapitre 3, le développement du poulet et de la souris diffèrent de manière significative de celui des amphibiens et du poisson en raison de l'aspect des jeunes embryons, de la chronologie de la spécification des feuillets embryonnaires, de la gastrulation se manifestant par l'existence d'une ligne primitive et non d'un blastopore. Le chapitre débutera par l'observation, à partir de l'œuf fécondé, du développement du poulet et de la souris, comparé à celui du xénope. Les différences importantes entre les développements précoces du poulet et de la souris seront examinées, alors que la gastrulation et le développement tardif des oiseaux et des mammifères apparaissent davantage semblables. À l'approche de l'organogenèse succédant à la gastrulation, où s'établit le plan définitif de l'organisation générale corporelle (voir Fig. 3.2), les similitudes entre les embryons de vertébrés deviennent plus grandes.

Les seconde et troisième parties du chapitre se focaliseront sur certains événements survenant au cours de l'organogenèse. Seront ainsi prises en considération chez le poulet et la souris, des structures tissulaires dorsales du tronc, la chorde, la moelle épinière et les somites, et en particulier la formation et le modelage des somites, blocs tissulaires d'origine mésodermique situés de part et d'autre de la chorde dont sont issus les vertèbres, les muscles squelettiques du tronc et une partie du derme de la peau.

Le long de l'axe antéro-postérieur troncal, les différentes régions du système nerveux dérivé de l'ectoderme ainsi que des structures mésodermiques telles que les somites, possèdent une identité distincte par rapport à cet axe. Chez le poulet et la souris, une organisation antéro-postérieure initiale des feuillets embryonnaires s'établit lors de l'induction du mésoderme, quand celui-ci s'individualise de l'endoderme et de l'ectoderme, mais quelques faits importants concernant cette configuration se produisent plus tardivement. Celle-ci est, à la fois pour le système nerveux et le mésoderme, sous le contrôle de gènes Hox, homologues de ceux responsables du patron antéro-postérieur chez la drosophile (voir Chapitre 2). Il sera discuté ici du rôle des gènes Hox dans l'établissement du patron du mésoderme somitique selon l'axe antéro-postérieur, comme cela peut être mis en évidence au niveau des vertèbres de la colonne vertébrale de la souris. Les gènes Hox et leurs rôles dans l'établissement du patron antéro-postérieur sont communs à tous les vertébrés, mais leurs fonctions ont été plus particulièrement bien étudiées chez la souris, pour laquelle des techniques de *knock-out* de gènes spécifiques sont commercialement disponibles (voir Section 3.10).

Un caractère propre aux vertébrés est l'existence de **crêtes neurales** qui apparaissent en bordure de la plaque neurale. Lors de la neurulation, les cellules des crêtes neurales commencent à migrer à partir du sommet du tube neural en formation. Les cellules migrent vers divers sites corporels où elles seront à l'origine d'une large variété de tissus dont les systèmes nerveux autonome et sensoriel, les tissus conjonctifs de la tête et notamment les tissus osseux de la face. Dans ce chapitre seront examinés la genèse des cellules des crêtes neurales et comment l'expression des gènes Hox spécifie leur identité régionale céphalique. La migration des cellules des crêtes neurales est traitée dans le Chapitre 9. L'organisation régionale ainsi que le développement du cerveau et du système nerveux central sont considérés dans le Chapitre 12.

Enfin, il sera considéré brièvement un trait singulier de l'organisation corporelle des vertébrés, à savoir l'asymétrie gauche-droite. Bien que le corps des vertébrés ait une apparence externe symétrique, il existe une asymétrie gauche-droite interne, s'exprimant par exemple par les positions du cœur et du foie, et il sera vu que cette asymétrie se met en place précocement au cours de la vie embryonnaire.

Mise en place du plan corporel chez le poulet et la souris

5.1 La polarité antéro-postérieure du blastoderme de poulet est associée à la ligne primitive

Relativement peu de chose est connu à propos du développement précoce du poulet dans la mesure où celui-ci se déroule avant que l'œuf soit pondu et les embryons de cette période sont difficiles à obtenir. Quand l'œuf est pondu, l'embryon consiste en un blastoderme circulaire, constitué de 32 000 à 60 000 cellules selon les estimations, et qui est disposé au sommet d'une volumineuse masse de vitellus (voir Section 3.3). La région centrale du blastoderme, l'aire pellucide, consiste en une monocouche de cellules épiblastiques, entourée par l'aire opaque, avec entre les deux aires, une fine couronne cellulaire formant la zone marginale (voir Fig. 3.15). Même à ce stade,



le blastoderme est déjà asymétrique, et ceci devient rapidement évident quand un épaississement cellulaire appelé croissant de Koller se développe en un point de l'aire pellucide (Fig. 5.1). Comme cela a été vu dans la Section 3.3, ce croissant cellulaire repose contre la zone marginale postérieure, et indique l'emplacement à partir duquel se développera la ligne primitive au niveau de l'épiblaste lors de la gastrulation. Cette ligne primitive révèle le sens de l'axe antéro-postérieur de l'embryon : son point de départ indique la région postérieure cependant que son allongement s'effectue vers la région antérieure, avec le nœud (souvent appelé nœud de Hensen chez le poulet, voir Fig. 3.16) qui se forme à l'extrémité antérieure de la ligne.

La ligne primitive définit également le futur axe dorso-ventral de l'embryon, avec les structures les plus ventrales étant issues de l'extrémité la plus postérieure de la ligne, comme le mésoderme extra-embryonnaire et le mésoderme des lames latérales, et les structures dorsales telle que la chorde provenant du nœud situé à l'extrémité antérieure de la ligne, comme cela sera examiné plus loin dans ce chapitre. La localisation de la zone marginale postérieure est par conséquent cruciale pour la mise en place des axes corporels.

Comment donc la symétrie radiaire du blastoderme de poulet disparaît-elle et la localisation de la zone marginale postérieure est-elle déterminée ? Il a été vu que la rupture de symétrie de la blastula chez le xénope était causée, très rapidement après la fécondation, par une redistribution de déterminants maternels dorsaux. L'embryon de poulet ressemble à ceux de la grenouille et des poissons, par le contrôle qu'exercent, sur les stades de la segmentation, des facteurs maternels déposés durant l'ovogenèse, l'activation des gènes zygotiques n'intervenant que dans les derniers stades. On ne sait cependant pas si durant la segmentation chez le poulet des facteurs maternels sont transmis asymétriquement dans des cellules et déterminent les axes embryonnaires. Il semblerait plutôt que l'axe antéro-postérieur est spécifié plus tard, sous l'influence de forces rotationnelles lors du transit de l'œuf dans l'oviducte et l'utérus.

L'œuf descend dans l'utérus, son bout pointu en avant et tourne lentement sur luimême, chacune de ses révolutions durant environ 6 minutes. Alors que la coquille fait sa rotation, le blastoderme est tenu dans une position inclinée selon un angle d'environ 45° par rapport à la verticale, ce qui fait que les divers bords du blastoderme sont exposés à différentes régions du vitellus qui sont réorientées sous l'influence de la gravité. Le bord tourné vers le bas sera la zone de la future région céphalique cependant que la zone marginale postérieure se développe à la bordure du blastoderme la plus haute (Fig. 5.2). Les molécules dans le vitellus susceptibles d'être redistribuées par gravité et de spécifier l'axe antéro-postérieur du blastoderme sont totalement inconnues. De plus, l'axe n'est pas fixé de façon irréversible par ces événements. Le blastoderme du poulet possède un grand pouvoir de régulation, car même au stade où il contient plusieurs dizaines de milliers de cellules, il peut être fractionné en de multiples fragments qui développeront chacun un axe embryonnaire complet.

La zone marginale postérieure peut être interprétée comme un centre organisateur, analogue à certains égards au centre de Nieuwkoop chez le xénope, en étant capable d'induire la formation d'un nouvel axe corporel. Si la zone marginale postérieure d'un blastoderme est greffée en position ectopique sur un autre blastoderme du même âge, une ligne primitive peut être induite à partir de cette nouvelle position (Fig. 5.3). Chez le poulet, parmi les protéines signal impliquées dans l'initiation d'une ligne primitive, se trouvent Vg-1, membre de la famille du TGF- β , qui est exprimé dans la zone marginale postérieure, et Wnt-8C qui, réparti au niveau de l'ensemble de la zone marginale,

Fig. 5.1 Blastoderme de poulet au début de la formation de la ligne primitive. Juste avant la ponte, l'embryon consiste en un blastoderme circulaire (à gauche) La région centrale translucide, l'aire pellucide, constituée d'une simple couche de cellules épiblastiques, est entourée par l'aire opaque plus sombre. Après la ponte, le croissant de Koller se développe, plaqué contre la zone marginale postérieure (stade pré-ligne primitive ; au centre) et ceci détermine la position à partir de laquelle la ligne primitive se formera dans l'épiblaste (Stade initial de la ligne primitive ; à droite). La ligne s'allonge ensuite antérieurement jusqu'à environ la moitié de l'épiblaste avec le nœud de Hensen se formant à son extrémité antérieure.



Fig. 5.2 La gravité détermine l'axe antéropostérieur chez le poulet. La rotation de l'œuf dans l'oviducte d'une poule conduit le blastoderme à être incliné dans la direction de la rotation, celui-ci tendant à se maintenir dans la position la plus haute. Les forces gravitationnelles réorientent le contenu vitellin comme le montre la coloration bleue. La zone marginale postérieure (P) se développe du côté où le blastoderme est en position la plus haute, et initie la ligne primitive. (A), région antérieure. est fortement concentrée dans la partie postérieure de cette même zone. Ces protéines signal ont déjà été mentionnées chez le xénope, avec des molécules Wnt associées à la formation de centres émetteurs de signaux chez la blastula et Vg-1 comme étant impliqué dans l'induction mésodermique. Quand des cellules d'une lignée fibroblastique exprimant Vg-1 sont greffées dans une région différente de la zone marginale (expérience comparable à celle illustrée dans la Fig. 5.3), celles-ci peuvent induire une ligne primitive ectopique complète. Ceci montre que les mêmes protéines peuvent être utilisées par différents vertébrés pour exercer des fonctions légèrement différentes selon un processus généralement conservé d'un point de vue évolutif.

Chez le poulet, cependant, on constate souvent qu'un seul axe se développe dans des embryons greffés, soit l'axe normal de l'hôte soit celui induit par la greffe. Ceci suggère que le plus avancé des deux centres organisateurs inhibe la formation d'une autre ligne primitive. Il a été montré que Vg-1 induit un signal inhibiteur qui peut traverser l'embryon sur une distance d'environ 3 mm en près de 6 heures, afin de prévenir la formation d'une autre ligne primitive. Vg-1 est ainsi nécessaire à l'initialisation d'une ligne primitive mais dans le même temps est impliqué dans l'inhibition de la formation d'une éventuelle deuxième ligne.

Peu après la ponte, une couche continue de cellules hypoblastiques recouvre immédiatement le vitellus au niveau de l'aire pellucide (voir Fig. 3.15). La formation de la ligne primitive dans l'épiblaste ne débute seulement que lorsque l'hypoblaste commence à être déplacé loin de la région marginale postérieure par une autre couche cellulaire, l'**endoblaste**, qui croît à partir de la même zone. L'hypoblaste inhibe activement la formation de la ligne primitive car son élimination complète conduit à l'apparition de multiples lignes primitives disposées au hasard.

L'inhibition de la mise en place d'une ligne primitive par l'hypoblaste est due à sa production de l'antagoniste Cerberus, homologue de la protéine du même nom chez le xénope, qui inhibe le signal Nodal émis par les cellules épiblastiques adjacentes à la zone marginale postérieure. L'expression de *Nodal* par ces cellules est induite par Wnt-8C et Vg-1. Nodal et FGF, produits respectivement par l'épiblaste et le croissant de Keller, sont requis pour que se forme une ligne primitive (Fig. 5.4), et c'est la raison pour laquelle cette ligne ne peut pas se former tant que l'hypoblaste n'aura pas été refoulée par l'endoblaste. Le pouvoir de régulation chez l'embryon de poulet persiste jusqu'au moment où débute la formation de la ligne primitive. Lorsqu'un embryon est découpé en plusieurs morceaux, un nouveau site d'expression de Vg-1 apparaît dans chacun d'eux.

5.2 La séparation des lignées cellulaires de l'embryon et des structures extra-embryonnaires s'effectue lors des stades précoces du développement chez la souris

Les œufs des mammifères sont très différents de ceux du xénope et du poulet en raison d'une absence de réserves vitellines et du fait que durant les stades précoces du développement se mettent en place des membranes vitellines extra-embryonnaires ainsi que le placenta reliant la mère à l'embryon et par lequel ce dernier peut être nourri. Bien que le développement de la souris se déroule au sein de l'organisme maternel, les stades précoces peuvent être étudiés car des ovocytes de souris fécondés *in vitro* se segmentent et se développent jusqu'au stade blastocyste en culture.

Les premières divisions de l'embryon de souris ne conduisent pas à une structure encore très ordonnée. Certaines divisions s'effectuent parallèlement à la surface du zygote, provoquant l'existence de populations cellulaires externes et internes. Au stade 32 cellules, la morula s'est transformée en un blastocyste, une sphère creuse de nature épithéliale, à l'intérieur de laquelle est attachée à l'un de ses pôles, une masse cellulaire interne de 10 à 15 cellules (Fig. 5.5, vignettes gauches). L'épithélium du blastocyste constituera le **trophectoderme** à l'origine des structures extra-embryonnaires impliquées dans l'implantation dans la paroi utérine et dans la formation du **placenta**, structure propre au développement de la plupart des mammifères. Les cellules de la masse cellulaire interne donneront l'épiblaste à partir duquel se développeront l'embryon et l'endoderme primitif à l'origine de la formation d'une structure extra-embryonnaire, la vésicule vitelline (ou lécithocèle). Les cellules de l'épiblaste sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent donner tous les types cellulaires de l'embryon (voir Section 1.17), et elles le restent jusqu'au stade E4,5.



Les cellules des masses cellulaires internes de la souris et de l'homme peuvent être isolées et mises en culture pour produire des cellules souches embryonnaires pluripotentes, les cellules ES. Comme cela est décrit dans le Chapitre 8, les cellules ES de souris cultivées peuvent donner tous les types cellulaires de l'embryon, dont les cellules germinales. Ces cellules ES peuvent être génétiquement modifiées et utilisées pour produire des souris porteuses de mutations spécifiques ou des transgènes (voir Section 3.10).

La spécification des cellules en celles de la masse cellulaire interne ou du trophectoderme dépend de leur positionnement dans l'embryon lors du clivage. Leur destinée ne se détermine qu'après le stade 32 cellules. Plus précocement, toutes ces cellules semblent être équivalentes quant à leur capacité à former n'importe quel type de tissus. La preuve la plus directe pour cet effet de position est apportée par les embryons chimères. Des blastomères isolés issus de la dissociation d'embryons au stade 8 cellules sont marqués puis associés dans différentes positions avec des blastomères non marqués provenant d'autres embryons. Des cellules marquées placées à l'extérieur d'un groupe de cellules non marquées, forment généralement du trophectoderme ; si elles sont placées en position interne, entourées par les cellules non marquées, elles sont le plus souvent à l'origine d'une masse cellulaire interne (Fig. 5.5, schémas de droite). Des agrégats formés entièrement de cellules soit « externes », soit « internes » d'embryons précoces peuvent se développer en blastocystes normaux, ce qui montre qu'à ces stades, pour ces cellules, il n'y a pas d'autre spécification que celle générée par leur position. Pour étudier l'effet de position, il est aussi possible d'utiliser des souris chimères issues de la combinaison de blastomères provenant de souches de souris différant par leur couleur de pelage (voir Fig. 1.24), cette dernière constituant un marqueur indélébile. Quand des cellules provenant d'un embryon au stade 8 cellules d'une souche de souris blanche, sont placées à l'extérieur d'un groupe de cellules issues d'embryons d'une souche noire au même stade, la souris chimère obtenue est de pelage noir, indiquant qu'elle s'est formée à partir des cellules situées en position interne.

À ces stades précoces du développement, une remarquable capacité de régulation existe. En effet, une seule cellule d'un embryon de souris au stade 32 cellules, peut être à l'origine de la formation d'un embryon complet quand elle est associée à des cellules tétraploïdes formant exclusivement le trophectoderme et soutenant le développement de l'embryon (voir Encart 8B). Par ailleurs, des embryons géants formés par l'association de plusieurs embryons à des stades précoces de la segmentation peuvent évoluer en embryons de taille normale en environ 6 jours par suite d'une réduction de la prolifération cellulaire.

La spécification des lignées du trophectoderme et de la masse cellulaire interne pluripotente constitue la première manifestation d'une différenciation lors du développement embryonnaire des mammifères, et celle-ci est primordiale pour la formation placentaire. Le trophectoderme forme d'une part, une interface épithéliale entre les tissus maternels et fœtaux, et est à l'origine d'autre part, de cellules invasives intervenant dans le remodelage des vaisseaux sanguins utérins et qui bordent les lacunes sanguines maternelles. Les facteurs de transcription Cdx2 et Oct4 sont respectivement impliqués dans la différenciation du trophectoderme, et dans la conservation du caractère pluripotent de la masse cellulaire interne. Ces deux facteurs sont exprimés par tous les Fig. 5.3 La zone marginale postérieure d'un blastoderme de poulet induit la ligne primitive. La zone marginale postérieure indique l'extrémité postérieure de l'axe antéro-postérieur. Des cellules de la zone marginale postérieure exprimant la protéine signal Vg-1 greffées latéralement à la zone marginale d'un autre blastoderme peuvent conduire à la formation d'une ligne primitive surnuméraire à partir du site de la greffe. Cependant, souvent ne se forment pas deux lignes primitives, celle qui se forme en premier ayant tendance à inhiber le développement de l'autre.



Fig. 5.4 Signaux dans la zone marginale postérieure de l'épiblaste de poulet qui initient la formation d'une ligne primitive. Les cellules épiblastiques de la zone marginale postérieure qui recouvrent le croissant de Koller sécrètent Vg-1 et Wnt. Ces molécules induisent l'expression du gène Nodal dans les cellules épiblastiques voisines, mais l'activité de son produit Nodal est bloquée par Cerberus sécrété par l'hypoblaste. Quand celui-ci est refoulé par l'endoblaste, Nodal et FgF, produits respectivement par l'épiblaste et le croissant de Koller, induisent l'internalisation des cellules épiblastiques et la formation d'une ligne primitive.

Fig. 5.5 La spécification des blastomères qui formeront la masse cellulaire interne d'un embryon de souris dépend de leur position. La spécification des blastomères pour constituer la masse cellulaire interne dépend de leurs positions externes ou internes dans l'embryon. Schémas de gauche : suite à la segmentation, l'embryon de souris est sous la forme d'une balle compacte de cellules (la morula). Celle-ci évolue en un blastocyste creux, constitué d'une masse cellulaire interne et d'une couche cellulaire épithéliale, le trophectoderme. Schémas de droite : afin d'étudier si la position d'un blastomère dans la morula détermine son devenir en trophectoderme ou en masse cellulaire interne, des blastomères marqués (en bleu) issus d'un embryon au stade huit cellules sont dissociés et combinés avec des blastomères non marqués (en gris) provenant d'un autre embryon. En suivant le devenir des descendants des cellules marquées, il est possible de montrer que les blastomères placés à l'extérieur de l'agrégat participent le plus souvent à la formation du trophectoderme, 97 % d'entre eux se retrouvant dans ce dernier. L'inverse est vrai en ce qui concerne l'origine de la masse cellulaire interne qui dérive principalement de blastomères situés en interne dans l'agrégat.



blastomères au stade 8 cellules, le gène *Oct4* s'exprimant déjà dans l'ovocyte (Fig. 5.6). Lors de la formation de la morula, les taux de Cdx2 augmentent légèrement dans les cellules périphériques. Puis, en raison d'une rétroaction négative réciproque entre *Cdx2* et *Oct4*, la protéine Cdx2 réprimant l'expression du gène *Oct4* et inversement, le niveau d'expression de *Cdx2* s'accroît alors qu'il baisse pour *Oct4* dans les cellules externes. Dans le même temps, c'est l'inverse qui s'observe dans les cellules internes. Dans le blastocyste, seuls sont exprimés *Cdx2* dans le trophectoderme et *Oct4* dans la masse cellulaire interne. Si *Cdx2* n'est pas fonctionnel, le trophectoderme se forme dans un premier temps au niveau du blastocyste, mais ne se différencie pas, puis disparaît.

L'activation de l'expression de Cdx2 dépend du facteur de transcription Tead4 dont l'activité est contrôlée par son co-activateur Yap. La localisation de Yap dans le noyau, où il peut interagir avec des facteurs de transcription tels que Tead4, est régulée par la voie de signalisation Hippo (décrite dans l'Encart 13A). Cette voie se comporte pour une cellule comme un capteur sensible à l'environnement et aux interactions avec d'autres cellules. Bien que les détails ne soient pas encore bien connus, on commence à entrevoir comment une cellule peut être informée de sa position dans la morula par l'activité de la voie Hippo, et comment cela détermine ensuite son devenir par le contrôle de l'expression de facteurs de transcription spécifiques.

Au stade E4,5, la masse cellulaire interne du blastocyste a commencé à se différencier en deux types de tissus : une monocouche d'**endoderme primitif** (à l'origine de structures extra-embryonnaires, mais non intestinales) qui constitue sa surface externe tournée vers le blastocèle, et l'épiblaste, recouvert par le tissu précédent, et à partir duquel se développeront l'embryon et quelques structures extra-embryonnaires (voir Fig. 5.6). La spécification des cellules, pour former l'endoderme primitif ou l'épiblaste, peut être suivie à partir des cellules de la morula chez lesquelles deux facteurs de transcription, Nanog et Gata6, sont faiblement exprimés. Au cours du vieillissement du blastocyste, des cellules apparaissent exprimant fortement Nanog et faiblement Gata6, cependant que d'autres font l'inverse, avec pour conséquence l'émergence de deux populations distinctes. Les cellules exprimant Nanog sont à l'origine de l'épiblaste et celles produisant Gata6 forment l'endoderme primitif. Le FGF joue un rôle important dans cette séparation. Les cellules exprimant Nanog produisent du FGF qui promeut l'expression de Gata6 dans les cellules voisines exprimant des récepteurs au FGF, ce qui renforce la probabilité que ces dernières deviennent constitutives de l'endoderme primitif (voir Fig. 5.6).

Dans la masse cellulaire interne, le recouvrement de l'épiblaste par l'endoderme primitif résulte d'un processus totalement différent de celui qui a conduit au positionnement de la masse cellulaire interne par rapport au trophectoderme. Au lieu que les cellules se différencient en fonction de leur position, les deux types cellulaires,



Fig. 5.6 Établissement des trois lignages cellulaires dans le blastocyste de souris. Les deux premiers types cellulaires à être spécifiés sont ceux du trophectoderme et de la masse cellulaire interne. Ceci implique une restriction progressive de l'expression des gènes codant les facteurs de transcription Oct4 et Cdx2. Au stade 8 cellules, toutes les cellules expriment faiblement les deux gènes. À des stades plus tardifs, morula/jeune blastocyste, l'expression de Cdx2 augmente, et au final se limite aux cellules les plus externes de l'embryon, qui constitueront le trophectoderme. Dans la jeune blastula, l'expression de Oct4 se restreint aux cellules de la masse cellulaire interne. À l'intérieur de celle-ci, apparaissent deux types cellulaires : les cellules épiblastiques, à partir desquelles l'embryon se développera, et l'endoderme primitif à l'origine de structures extra-embryonnaires. Ceci implique une restriction progressive de l'expression des gènes codant les facteurs de transcription Nanog et Gata6. Au stade blastula précoce, certaines cellules de la masse cellulaire interne commencent à exprimer fortement Nanog, apparemment de façon aléatoire, alors que d'autres expriment tout aussi fortement Gata6. Chez la blastula âgée, ces deux dernières catégories cellulaires se séparent à l'intérieur de la masse cellulaire interne : celles exprimant à un niveau élevé Gata6 forment une couche externe d'endoderme primitif entourant les cellules de l'épiblaste qui expriment fortement Nanog.

D'après Stephenson, R.O., et al. : Intercellular interactions, position and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonnic axes. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012, 4 : a008235.

l'épiblaste et l'endoderme primitif, sont ici spécifiés, éventuellement en fonction du temps, en un arrangement plus ou moins aléatoire dont ils s'extraient pour rejoindre leurs sites appropriés au sein de la masse cellulaire interne. L'apoptose peut aussi jouer un rôle en éliminant les cellules mal localisées.

Avant le stade blastocyste, l'embryon possède une forme sphérique à symétrie radiaire. Une première asymétrie apparaît lorsque se développe de manière asymétrique le blastocœle, entraînant l'attache de la masse cellulaire interne à une zone limitée du trophectoderme (Fig. 5.7). Le blastocyste présente alors clairement un axe passant par le site d'attachement des cellules internes (le pôle embryonnaire), et à l'opposé, le **pôle abembryonnaire**, le blastocœle occupant près de la moitié abembryonnaire. Cet axe est désigné sous le terme d'**axe embryonnaire-abembryonnaire**. Il correspond à l'axe dorso-ventral du futur épiblaste, géométriquement, mais il n'a pas de lien avec une quelconque spécification des destinées cellulaires.



Fig. 5.7 Les axes d'embryons précoces de souris. À la fin du stade blastocyste (à gauche), à environ E4,5, la masse cellulaire interne est confinée dans la région embryonnaire, ce qui définit un axe embryonnaire-abembryonnaire (qui correspondra géométriquement, mais non en termes de devenir des cellules, à l'axe dorso-ventral du futur épiblaste). La masse cellulaire interne est de forme ovoïde et possède de ce fait un axe de symétrie bilatérale. À E6,5 (figure de droite), l'axe antéro-postérieur devient visible dans l'épiblaste, avec la formation de la ligne primitive dans sa région postérieure. La face interne de la coupelle épiblastique correspond au côté dorsal du futur embryon, et la face externe à la future région ventrale de ce dernier.

5.3 Le mouvement de l'endoderme viscéral antérieur indique l'axe antéropostérieur définitif de l'embryon de souris

L'existence d'une **polarité** dans l'œuf de souris n'est pas clairement attestée et une quelconque contribution de facteurs maternels est difficile à évaluer, car contrairement à ce que l'on observe chez le xénope, l'activation des gènes zygotiques débute dans l'œuf fécondé et devient essentielle pour le développement au-delà du stade deux blastomères. Les avis restent à ce jour divisés quant à la possibilité d'une mise en place d'un axe embryonnaire liée à la première division de segmentation et d'un engagement des deux premiers blastomères dans des devenirs différents.

Le fort potentiel de régulation de l'embryon relativise l'importance du rôle des déterminants maternels lors du développement précoce de la souris. On sait depuis longtemps que si les deux premiers blastomères sont séparés, ils vont chacun être à l'origine d'un embryon complet. De plus, des blastomères isolés issus de stades embryonnaires postérieurs au stade 8 cellules peuvent contribuer largement à la fois à des tissus embryonnaires et placentaires. Enfin, un développement normal peut encore se réaliser après un prélèvement ou une addition de cellules à un blastocyste avant son implantation dans la paroi utérine. Ce grand pouvoir de régulation n'exclut cependant pas la possibilité qu'au cours du développement, des blastomères d'embryons précoces aient en propre des caractéristiques et des destinées différentes, et que des déterminants maternels puissent être différentiellement distribués entre blastomères. La discussion sur cette question reste ouverte.

Autour de E4,5, le blastocyste de souris s'implante dans la paroi utérine et le trophectoderme au pôle embryonnaire prolifère pour former le cône ectoplacentaire à l'origine d'un ectoderme extra-embryonnaire refoulant la masse cellulaire interne dans le blastocœle. Une cavité proamniotique, se forme ensuite dans l'épiblaste tandis que ses cellules prolifèrent. Ce dernier, chez la souris, est maintenant constitué d'une monocouche cellulaire formant une coupelle ou un U après section, recouverte en surface par une couche d'endoderme viscéral issu de l'endoderme primitif. Vers E5,0-E5,5, l'œuf cylindre possède une polarité proximo-distale en relation avec le site d'implantation, le cône ectoplacentaire étant à l'extrémité proximale et l'épiblaste en forme de coupelle en position distale (voir Fig. 3.23). L'ectoderme extra-embryonnaire forme une couche cellulaire distincte entre le cône ectoplacentaire et l'épiblaste.

L'événement clé suivant qui se produit vers E5,5, environ 12 à 24 heures avant le début de la gastrulation, implique l'endoderme viscéral qui commence à se régionaliser le long de l'axe proximo-distal de l'œuf cylindre. Les premiers indices d'une asymétrie peuvent être décelés précocement dans l'endoderme primitif du blastocyste dans lequel des cellules caractérisées par l'expression du gène codant Lefty-1, un antagoniste de Nodal, sont localisées sur un seul côté (le nom de « Lefty » provient du fait que cet antagoniste a d'abord été identifié en raison de sa forte expression sur le côté gauche de l'embryon à des stades plus âgés). Les cellules exprimant Lefty-1 viennent par la suite occuper une petite région de l'endoderme viscéral recouvrant la partie la plus distale de l'épiblaste, et désignée sous le terme d'endoderme viscéral distal (EVD). Celui-ci exprime un ensemble d'antagonistes extracellulaire de Nodal, Wnt et BMP, alors que Nodal est exprimé dans tout l'endoderme viscéral et qu'il induit l'expression de son gène Nodal dans l'ensemble de l'épiblaste. Le signal Nodal généré par l'épiblaste induit des cellules endodermigues viscérales supplémentaires situées près de l'EVD, à exprimer les mêmes molécules de signalisation que celles produites par l'EVD. Ces cellules constituent l'endoderme viscéral antérieur (EVA). Celui-ci se déplace rapidement de manière aléatoire vers l'un des côtés de la coupelle épiblastique, causant le déplacement de l'endoderme viscéral le plus proximal, et ce côté deviendra la région antérieure de l'embryon (Fig. 5.8). Cette rupture de symétrie provoque la conversion de l'axe proximo-distal de l'œuf cylindre en un véritable axe antéro-postérieur pour l'embryon de souris. L'EVA continue à exprimer les gènes pour les antagonistes de Wnt et Nodal, dont Dickkopf-1, Cerberus-like 1 et Lefty-1. (Les divers moyens par lesquels la signalisation Nodal peut être affinée sont évoqués dans l'Encart 5A). Au final, l'épiblaste dans sa position la plus haute devient l'ectoderme antérieur à partir duquel le cerveau antérieur et d'autres structures antérieures se développeront.



Fig. 5.8 La rupture de symétrie s'opérant chez l'embryon précoce de souris est due à un déplacement de l'endoderme viscéral antérieur vers l'un des côtés de la coupelle épiblastique. Autour du stade E5,5, avant la formation de la ligne primitive, l'endoderme viscéral exprimant Lefty-1 (en vert) se localise dans la zone la plus distale de la coupelle et il correspond à l'endoderme viscéral distal (EVD). Le reste de l'endoderme viscéral est figuré en jaune. Vers E5,75, l'endoderme viscéral au voisinage de EVD commence à être spécifié en endoderme viscéral antérieur (EVA) suite aux signaux Nodal émis à partir de l'épiblaste (flèches rouges). La formation de EVA est restreinte à la région distale de l'endoderme viscéral suite à des signaux inhibiteurs provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire

proximal (traits barrés bleus). EVA se déplace ensuite sur l'un des côtés de la coupelle et, suite aux signaux qu'il émet (flèches jaunes), l'épiblaste en position haute devient de l'ectoderme antérieur (en bleu pâle) qui inclut le futur neuroectoderme. À E6,5, du côté opposé de l'épiblaste, la ligne primitive (en rouge pâle) a commencé à se former indiquant ainsi l'extrémité postérieure de l'axe antéro-postérieur. Le signal Wnt, au départ présent dans l'endoderme viscéral postérieur, induit la signalisation Wnt dans l'épiblaste, et celle-ci active la signalisation Nodal, requise pour la formation de la ligne primitive. *Illustration d'après Rodriguez, T.A., et al.* : **Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm.** Development 2005, **132** : 2513-2520.

Malgré des différences de topologie, le déroulement du développement est similaire à celui décrit précédemment pour le poulet (voir Section 5.1) : l'EVA est équivalent à l'hypoblaste du poulet, qui comme lui empêche la formation de la ligne primitive. Dans les deux cas, ceci est dû à ce que les cellules de ces structures produisent des protéines contrecarrant la signalisation Nodal : Cerberus chez le poulet ; Lefty-1 et Cerberus-like chez la souris (voir Encart 5A). Le déplacement de l'EVA vers le côté antérieur de la coupelle conduit ainsi directement à l'initiation de la ligne primitive au côté opposé qui devient l'extrémité postérieure de l'embryon. La formation de la ligne primitive débute autour de E6,5. *Wnt-3* est au départ exprimé dans l'endoderme viscéral postérieur et ensuite, également avec *Nodal*, dans l'épiblaste postérieur. Ainsi, les signaux qui initient la formation de la ligne primitive sont vraisemblablement Wnt et Nodal, les mêmes signaux qui sont impliqués dans l'initialisation de cette ligne dans la zone marginale postérieure de l'épiblaste de poulet (voir Fig. 5.4).

L'ectoderme extra-embryonnaire situé à l'extrémité proximale de l'œuf cylindre de l'embryon au stade E5,75 joue un rôle en restreignant initialement la formation de l'EVA dans la partie la plus distale de l'endoderme viscéral. À ce stade, le signal Nodal est partout présent dans l'épiblaste et devrait, en principe, induire un devenir de type EVA pour l'ensemble de l'endoderme viscéral. Mais l'ectoderme extra-embryonnaire est une source de signaux BMP (voir Encart 4C), ceux-ci empêchant la formation de l'EVA. La bordure proximale de l'épiblaste est exposée à de forts signaux BMP, ce qui fait que l'EVA se forme distalement, là où ces signaux sont les plus bas. Si l'ectoderme extra-embryonnaire est enlevé, il se produit une très importante expansion de l'EVA du fait de l'absence du signal BMP.

5.4 Les cartes des territoires présomptifs des embryons de vertébrés se présentent comme des variations d'un même plan de base

Il est difficile d'établir des cartes de territoires présomptifs reproductibles pour les embryons de poulet et de souris à un stade correspondant à la blastula de xénope. Ceci vient du fait que les cellules qui participeront à la formation des différents feuillets embryonnaires sont mélangées dans l'épiblaste et qu'il existe d'importants

ENCART 5A Régulation fine du signal Nodal

La protéine Nodal de souris et les protéines apparentées à Nodal chez d'autres vertébrés sont, à des stades précoces embryonnaires, des protéines de signalisation sécrétées essentielles pour l'induction et l'organisation du mésoderme, ainsi que pour l'établissement de l'asymétrie gauche-droite. Des molécules de signalisation qui possèdent un pouvoir aussi puissant sur le développement doivent être étroitement régulées afin qu'elles soient présentes en quantité adéquate au bon endroit et au bon moment. La force du signal Nodal peut être modulée et régulée à plusieurs niveaux comme le montre la Figure ci-contre.

Un premier niveau est la production d'une protéine fonctionnelle (1). Comme beaucoup de facteurs de croissance, Nodal est synthétisée et sécrétée sous la forme d'un précurseur inactif qui doit être converti en une forme active suite à un clivage protéolytique. Ce dernier est réalisé par des enzymes appelées convertases pro-protéines. Si ces dernières ne sont pas présentes, même si le gène *Nodal* est exprimé, aucune protéine Nodal fonctionnelle ne sera produite.

Un second niveau de contrôle est assuré par des inhibiteurs extracellulaires qui, en se liant à Nodal et/ou à ses récepteurs (2), empêchent le signal d'atteindre sa cible, comme cela est évoqué dans ce chapitre. Comme les autres membres de la famille du TGF- β , Nodal se fixe à des récepteurs hétérodimériques du type I/II et initie une cascade de signaux de transduction dans laquelle des protéines Smad sont phosphorylées et entrent dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cibles (voir Encart 4C). Cerberus-1 et Lefty-1 et 2 comptent parmi les antagonistes extracellulaires du signal Nodal.

Un troisième niveau de contrôle s'effectue via la régulation de la transcription du gène Nodal, qui est lui-même une cible de la signalisation Nodal (3). L'expression de Lefty, cerberus et Nodal peut être accrue en réponse du signal Nodal, et ceci peut conduire par un rétrocontrôle négatif ou positif à une modification de la guantité présente de Nodal. Une boucle rétroactive négative, dans laquelle Nodal augmente l'expression de Lefty, régule finement le niveau du signal Nodal dans le blastoderme du poisson-zèbre et l'organisation proximo-distal de l'épiblaste de souris. Dans ce dernier, Nodal induit l'endoderme viscéral antérieur (EVA), qui sécrète alors les protéines Cerberus-like et Lefty-1, celles-ci diminuant en retour l'expression de Nodal dans la zone avoisinant l'épiblaste, permettant à cette dernière de devenir l'extrémité antérieure de l'axe antéro-postérieur. Une boucle rétroactive positive, dans laquelle le signal Nodal augmente l'expression de Nodal, intervient dans l'établissement de l'asymétrie gauchedroite et conduit à des taux élevés de Nodal sur la gauche du nœud des embryons de souris (voir Section 5.16). Un mécanisme du type réaction-diffusion peut également agir (voir Encart 11E). Un autre niveau de régulation fine du signal Nodal a récemment été découvert qui implique une inhibition spécifique de la traduction des messagers de Nodal et de Lefty par des microARN (4) (voir Encart 6C concernant la fonction des microARN).

De manière surprenante, beaucoup de molécules jouant un rôle clé dans la spécification du plan corporel des vertébrés agissent comme des antagonistes extracellulaires ou des inhibiteurs



ou modulateurs de molécules de signalisation intercellulaires. D'autres molécules de signalisation intervenant fréquemment au cours du développement telles que Wnt et BMP, ont des antagonistes qui contrecarrent leur expression ou leur activité à certains niveaux (voir le résumé Chapitre 4). Ces molécules établissent avec leurs antagonistes des boucles rétroactives positives ou négatives de manière similaire à ce qui est observé avec Nodal. Chez le xénope, par exemple, les signaux « dorsalisant » produits par l'organisateur de Spemann, comprennent Noggin et Chordin qui bloquent l'action du signal « ventralisant » BMP-4 (voir Section 4.13). Au cours de l'organisation antéro-postérieure de l'épiblaste de l'embryon de souris, le signal « postériorisant » Wnt est bloqué par l'antagoniste extracellulaire Dickkopft-1 produit dans la région antérieure.




Fig. 5.9 Carte des territoires présomptifs d'un embryon de poulet quand la ligne primitive est entièrement formée. L'embryon est illustré ici en vue dorsale. Presque tout l'endoderme a déjà été internalisé après sa pénétration au niveau de la ligne primitive et n'est donc pas représenté.



mouvements cellulaires à la fois avant, et pendant, la formation de la ligne primitive. Chez une jeune blastula de poulet, les cellules épiblastiques voisines de la zone marginale postérieure sont grossièrement équivalentes aux cellules dorsales de la blastula de xénope à l'origine de la future chorde. Les cellules équivalentes chez la souris sont celles de l'épiblaste initialement voisines de l'endoderme viscéral postérieur dans l'œuf cylindre. Tout devient plus clair une fois que la ligne primitive s'est formée et que des cellules ayant été déterminées en tant que mésodermique ou endodermique entament leur mouvement de pénétration.

La carte des territoires présomptifs vue au niveau de l'épiblaste d'un embryon de poulet constitué des 3 feuillets embryonnaires est illustrée dans la Fig. 5.9. Quelques cellules issues de l'épiblaste se sont déjà intériorisées au niveau de la ligne primitive pour former des feuillets endo- et mésodermiques, non représentés ici. Après leur pénétration, les cellules mésodermiques qui formeront le cœur, migrent en deux lots selon une direction antéro-latérale et donneront les premiers champs bilatéraux cardiaques (voir Chapitre 11). La plupart des cellules de l'épiblaste antérieur constituent maintenant le futur ectoderme, et formeront le tube neural et l'épiderme, mais il reste encore des cellules épiblastiques se dirigeant vers la ligne primitive qui s'inséreront dans du mésoderme. Le nœud de Hensen et l'extrémité antérieure de la ligne primitive ont un devenir mésodermique ; au fur et à mesure que le nœud recule, il laisse derrière lui des cellules qui formeront la chorde et qui contribueront à la formation des somites, tandis que les cellules épiblastiques bordant l'axe médian antéro-postérieur non seulement participeront à la formation des somites mais aussi du mésoderme des lames latérales (montré comme une région unique dans la Fig. 5.9) et d'organes comme les reins. La région la plus postérieure de la ligne primitive sera incorporée dans le bourgeon caudal et formera du mésoderme extra-embryonnaire.

La carte des territoires présomptifs présentée dans la Fig. 5.10 est celle d'un embryon de souris autour de E7-7,5, montrant l'épiblaste ayant subi une transformation en trois feuillets embryonnaires suite à la gastrulation. Cette dernière est très similaire à celle du poulet, mais la forme incurvée de l'épiblaste de la souris rend difficile le suivi de la mise en place de la ligne primitive et de la formation du nœud. La Figure 5.10 montre l'embryon comme si sa structure en coupelle avait été ouverte, puis sa face concave interne aplatie et observée en vue dorsale. On constate que la carte pour la



Fig. 5.11 Cartes des territoires présomptifs d'embryons de vertébrés à des stades comparables de développement.

En dépit de toutes les différences du développement précoce, les cartes des territoires présomptifs des embryons de vertébrés à des stades équivalents, de la blastula âgée à la jeune gastrula montrent, de fortes similitudes. Toutes les cartes sont montrées en vue dorsale. Le mésoderme de la future chorde occupe une position dorsale centrale. Le neuroectoderme présomptif repose sur la chorde, le reste de l'ectoderme étant localisé antérieurement par rapport à celle-ci. La carte de la souris est représentée à un stade gastrula âgée. L'ectoderme épidermique du poisson-zèbre est situé sur la face ventrale. Chez le poulet, l'endoderme présomptif a déjà pénétré à l'intérieur de l'embryon.

souris au stade de la ligne primitive est fondamentalement similaire à celle du poulet. Il peut être utile de consulter les Figures 3.24 et 3.25 montrant l'épiblaste de souris incurvé, pour aider à comprendre sa carte des territoires présomptifs.

Comme chez le poulet, la région antérieure de l'épiblaste de souris est à l'origine de l'ectoderme et le nœud donnera la chorde. Les cellules qui formeront le cœur ont déjà pénétré et s'éloignent du nœud, comme l'ont fait également certaines cellules qui constitueront l'endoderme définitif du tube digestif et le mésoderme dorsal. L'extrémité antérieure de la ligne primitive donnera encore de l'endoderme, tandis que la partie médiane de celle-ci sera principalement à l'origine des somites et du mésoderme des lames latérales. La partie postérieure, quant à elle, deviendra le bourgeon caudal et produira le mésoderme extra-embryonnaire. L'embryon de souris conserve un remarquable pouvoir de régulation jusqu'à la fin de la gastrulation. Même au stade de la ligne primitive, le développement d'un embryon révélant peu d'anomalies peut s'observer, après qu'aient été détruites plus de 80 % des cellules épiblastiques par une drogue cytoxique, la mitomycine C. Ceci révèle l'importance de la continuité des relations intercellulaires.

Chez les vertébrés, les cartes des territoires présomptifs sont similaires quand on prend en considération les relations entre les feuillets embryonnaires et le site où s'effectue le mouvement de pénétration des cellules lors de la gastrulation (Fig. 5.11). La position relative des cellules donnant des tissus semblables chez leurs embryons est également conservée, malgré leurs très diverses morphologies. C'est également le cas à un stade précédant la gastrulation quand, comme cela fut évoqué plus haut, l'EVA de souris apparaît l'équivalent de l'hypoblaste antérieur du poulet. Si on imagine le blastoderme de poulet enroulé avec l'épiblaste sur la face externe, son hypoblaste pourrait être alors considéré comme l'équivalent des cellules végétatives du plancher du blastocèle de la blastula de xénope et de la couche syncytiale vitelline dorsale du poisson-zèbre (Fig. 5.12). Ce type de représentation peut rendre aussi plus visible, chez des jeunes gastrulas, la similitude des relations spatiales existant entre différents tissus, tel que le nœud et l'organisateur de Spemann du xénope, les futurs feuillets embryonnaires et le tissu nerveux de différents embryons.

5.5 L'induction mésodermique et la mise en place du plan d'organisation chez le poulet et la souris s'effectuent pendant la formation de la ligne primitive

Chez le poulet, la majorité de l'induction mésodermique et la mise en place du plan d'organisation se réalisent lors de la formation de la ligne primitive. Avant celle-ci, l'épiblaste isolé donnera quelques structures mésodermiques contenant des vaisseaux sanguins, des cellules sanguines et un peu de muscle mais pas de structures mésodermiques dorsales telle la chorde. Comme dans les expériences menées sur les cellules de la coiffe animale de xénope (voir Section 4.12), le traitement d'un épiblaste isolé avec de l'activine provoque l'apparition d'une chorde supplémentaire et davantage de muscle. Ceci indique que les membres de la famille des TGF- β peuvent agir chez le poulet en tant que signaux inducteurs et/ou organisateurs du mésoderme comme ils le font chez le xénope.

Fig. 5.12 Comparaison topologique des différentes régions d'embryons de souris, de poulet, de xénope et de poisson-zèbre aux stades pré- et jeune gastrula. Il est possible de constater qu'une simple transformation topologique révèle une similitude dans l'organisation des différents embryons. L'aplatissement d'un œuf cylindre produit l'équivalent d'un blastoderme de poulet. L'enroulement de ce dernier avec l'épiblaste en position externe, qu'accompagne un relatif accroissement de la masse de l'hypoblaste, conduit à la formation d'un embryon de xénope. L'oblitération presque totale de son archentéron avec un surplus de masse vitelline aboutit approximativement à l'embryon du poisson-zèbre. La légende se réfère aux tissus de la souris. A, antérieur ; P, postérieur ; D, dos, V, ventre.

D'après Beddington, R.S. and Robertson, E.J. : Anterior patterning in mouse. Trends Genet. 1998, **14** : 277-284.

Comme il a été vu dans la Section 5.1, la zone marginale postérieure est primordiale chez l'embryon de poulet pour la formation de la ligne primitive. Nodal, membre de la famille des TGF- β produit par la zone marginale postérieure et la ligne primitive (voir Fig. 5.3), et le FGF produit par le croissant de Koller, induisent ensemble l'internalisation des cellules de l'épiblaste pour former le mésoderme. Celui-ci exprime le gène brachyury. L'expression de ce dernier est l'un des marqueurs les plus précoces du mésoderme chez le xénope et le poisson-zèbre et c'est également le cas chez le poulet. L'établissement du patron du mésoderme dorso-ventral a lieu au niveau de la ligne primitive, la régionalisation de celle-ci donnant naissance à différents tissus mésodermiques selon l'axe dorso-ventral corporel. Ce dernier est orthogonal à l'axe antéro-postérieur, mais à ce stade le plan corporel est établi dans un feuillet aplati de cellules et les termes axial, médian (au niveau et le long de la ligne médiane) et latéral sont plus utiles que dorsal et ventral. Le mésoderme somitique qui s'étend le long de chaque côté de l'axe médian est souvent désigné sous le terme de mésoderme para-axial. La région antérieure de la ligne primitive, incluant le nœud de Hensen, est à l'origine du mésoderme axial et para-axial, la chorde et les somites, respectivement, et aussi du cœur, tandis que la région postérieure génère le mésoderme latéral incluant le sang et les vaisseaux, ainsi que le mésoderme extra-embryonnaire (Fig. 5.13). Les cellules en position les plus postérieures migrent progressivement vers l'avant et vers l'extérieur pour se localiser finalement plus latéralement.

Chez la souris, l'induction mésodermique a lieu dans la ligne primitive, qui commence à se former vers E6,5, en débutant à partir d'une petite région localisée sur un côté de l'épiblaste (voir Fig. 3.4). La spécification de cette région résulte de la détermination de l'extrémité antérieure de l'embryon par suite du déplacement de l'EVA (voir Section 5.3). Au moment où l'ectoderme antérieur devient déterminé, les cellules épiblastiques proximales qui expriment des gènes caractéristiques du futur mésoderme tel que *brachyury* (*T*), commencent à converger vers la région postérieure et à s'internaliser à un point de convergence pour initier la formation de la ligne primitive (Fig. 5.14, à gauche et au centre). BMP-4 est exprimé dans l'ectoderme extra-embryonnaire situé au-dessus du bord proximal de l'épiblaste et active l'expression des marqueurs mésodermiques dans les cellules voisines de l'épiblaste proximal. Wnt-3 est au départ exprimé dans l'endoderme viscéral postérieur et ensuite dans la région postérieure de l'épiblaste où il active l'expression de *Nodal* qui est nécessaire à la formation du mésoderme. Chez les mutants n'exprimant pas *Nodal*, le mésoderme ne se forme pas. Wnt-3 active également l'expression de *brachyury*.

Chez la souris, comme chez le poulet, l'organisation dorso-ventrale du mésoderme s'effectue durant la gastrulation au niveau de la ligne primitive, la régionalisation de celle-ci étant à l'origine des différents tissus mésodermiques se formant le long de l'axe dorso-ventral. Les cellules situées à la toute extrémité antérieure de la ligne primitive sont les premières à s'internaliser et formeront à la fois la plaque préchordale axiale et l'endoderme embryonnaire définitif. Ces cellules s'internalisent ensemble et sont identifiées de ce fait comme de l'endomésoderme axial, la manière dont s'opère la ségrégation cellulaire pour constituer des tissus différents restant inconnue. Les cellules qui s'internalisent dans les régions plus postérieures de la ligne primitive forment le mésoderme para-axial et celui des lames latérales, cependant que celles qui le font dans la région postérieure la plus extrême donneront du mésoderme extra-embryonnaire (voir Fig. 5.14).





Fig. 5.13 Le devenir du mésoderme se décide au niveau de la ligne primitive du poulet. Les différentes zones de la ligne primitive donneront naissance aux divers types de mésoderme. Les flèches indiquent les mouvements migratoires des cellules mésodermiques.

Fig. 5.14 Spécification de la ligne primitive dans l'embryon de souris. À

gauche : au stade E6, l'endoderme viscéral antérieur (EVA) a induit un caractère antérieur à l'épiblaste sus-jacent (petites flèches) et les marqueurs précoces de la future ligne primitive se limitent au bord proximal de l'épiblaste. Les pointillés mauves représentent des cellules exprimant brachvurv. Au centre : au stade E6,5, BMP-4 est transitoirement exprimé dans les cellules de l'ectoderme extra-embryonnaire voisin (pointillés rouges), et le mouvement postérieur (grande flèche blanche) de cellules exprimant des marqueurs de la ligne primitive (pointillés mauves) a pour conséquence la formation de cette ligne à l'extrémité de l'embryon, à l'opposé de EVA. À droite : à E7, le mésoderme extra-embryonnaire (en brun) se forme à partir de l'extrémité postérieure de la ligne primitive (flèche blanche), cependant que le nœud se forme (en rouge) à l'extrémité antérieure. Tout au bout de cette dernière, la ligne primitive donne naissance à un tissu appelé endomésoderme qui formera la plaque préchordale et l'endoderme du tube digestif (flèche blanche).

La formation de l'endomésoderme chez la souris nécessite une signalisation Nodal. Celle-ci provient de la région postérieure épiblastique de l'embryon à environ E6,5 et possède une gradation dans la ligne primitive, avec un niveau élevé du signal spécifiant l'endomésoderme axial dans la région antérieure, et un niveau faible dans les régions intermédiaires, spécifiant le mésoderme para-axial et celui des lames latérales.

5.6 Le nœud qui se développe à l'extrémité antérieure de la ligne primitive chez le poulet et la souris est équivalent à l'organisateur de Spemann chez le xénope

Chez les oiseaux, la structure équivalente à l'organisateur de Spemann est le nœud de Hensen situé à l'extrémité antérieure de la ligne primitive (voir Fig. 3.16). Chez la souris, une structure semblable localisée également à l'extrémité de la ligne primitive, est simplement désignée sous le terme de nœud (voir Fig. 3.24). Nœud et nœud de Hensen, possèdent tous les deux une activité organisatrice et peuvent induire la formation d'un second axe corporel après leur transplantation dans un embryon hôte à un stade approprié. Cet axe surnuméraire est structuré dans les deux directions antéro-postérieure et dorso-ventrale et développe son propre système nerveux. Dans une expérience classique effectuée dans les années 1930, l'embryologiste anglais Conrad Waddington a montré directement l'équivalence des organisateurs des mammifères et d'oiseaux en greffant le nœud d'un embryon de lapin dans un embryon de poulet. Le greffon provoqua la formation d'un second axe chez celui-ci, prouvant ainsi que les signaux émis par les organisateurs du lapin et du poulet sont les mêmes mais que leur interprétation est gouvernée par la nature des tissus receveurs. L'application de cette même règle sera vue à propos d'autres centres émetteurs de signaux de vertébrés, comme par exemple la zone d'activité polarisante dans le membre en développement (traité au Chapitre 11).

L'approfondissement des propriétés inductrices du nœud des oiseaux a été réalisé par des transplantations caille-poulet. Le fait que les cellules de caille diffèrent de celles du poulet par leurs caractéristiques nucléaires, ce qui permet de les distinguer sur coupes histologiques (voir Fig. 3.33), ou par l'emploi d'anticorps zoospécifiques, a fourni le moyen de détecter précisément quels tissus sont issus de la greffe et quels tissus sont induits. Quand par exemple, un nœud d'embryon de caille au stade gastrula est greffé latéralement sous l'épiblaste d'un embryon de poulet au même stade, le greffon peut induire la formation d'un axe corporel complet surnuméraire avec une tête. Mais quand le nœud est prélevé chez un embryon plus âgé au stade du développement céphalique, le greffon induit un tronc seul mais pas de tête (Fig. 5.15). Ainsi, les propriétés inductrices du nœud changent durant la gastrulation de la même façon que pour l'organisateur de Spemann chez le xénope (voir Section 4.14).

Chez la souris, la greffe d'un nœud issu d'une gastrula âgée dans une région latérale postérieure de l'épiblaste d'un embryon au même stade E7,5 provoque la formation d'un axe surnuméraire sans tête mais pourvu de structures postérieures incluant du tissu neural et des somites ectopiques. Le nœud donne naissance à la chorde et à un peu d'endoderme. Des greffes de précurseurs du nœud provenant de stades précédant ceux de la ligne primitive révèlent également des capacités inductrices à l'exception de celles nécessaires à la formation d'une tête.





L'importance d'une duplication axiale induite par des greffes d'un organisateur chez différents vertébrés dépend de sa composition cellulaire quand il est transplanté. Chez la souris, l'activité de l'EVA maintient à un niveau bas les signaux Wnt, Nodal et BMP dans l'épiblaste sus-jacent et est nécessaire pour initier la mise en place du patron antérieur avant la gastrulation et le développement du nœud. Ceci explique la raison pour laquelle, chez la souris, les axes surnuméraires, générés par la greffe d'un nœud, sont dépourvus de structures antérieures. Il a été suggéré que les cellules végétatives dans la région de l'organisateur du xénope et que les cellules syncytiales vitellines dorsales de la région de l'écusson embryonnaire du poisson-zèbre (voir Section 4.18) exercent le même rôle que celui de l'endoderme viscéral antérieur de souris. C'est pourquoi la transplantation d'organisateurs de xénope et de poisson-zèbre contenant ces cellules, entraîne des duplications complètes. L'hypoblaste du poulet correspond à l'endoderme viscéral de souris (voir Fig. 5.12) et des transplants de nœud de Hensen précoce, qui entraînent des duplications complètes, peuvent contenir quelques cellules hypoblastiques. La capacité qu'ont les nœuds des mammifères à produire un deuxième axe embryonnaire chez le poulet, confirme que les molécules de signalisation produites par les organisateurs des vertébrés sont communes à tous ces derniers.

Chez les vertébrés, un certain nombre de gènes codant pour des facteurs de transcription et des protéines de signalisation sont spécifiquement exprimés par les organisateurs et sont nécessaires à leur fonctionnement. La Figure 5.16 récapitule certains des gènes exprimés à la fois dans l'organisateur de Spemann du xénope et dans le nœud de la souris. Parmi les produits de ces gènes, se trouve le facteur de transcription Goosecoïd, un marqueur précoce de l'organisateur chez tous les vertébrés. De plus, plusieurs antagonistes sont exprimés et qui, sécrétés, seront responsables des gradients des signaux TGF- β et Wnt chez l'embryon. De tels gradients seront à l'origine d'une information de position pour l'organisation dorso-ventrale et antéro-postérieure du mésoderme et aussi pour l'induction de la plaque neurale. Il est cependant important de garder en mémoire que si beaucoup de protéines produites dans et autour de l'organisateur de différents vertébrés sont identiques, elles n'ont pas forcément toutes les mêmes fonctions. Fig. 5.15 Le nœud de Hensen peut induire un second axe corporel chez les embryons d'oiseaux. Quand un nœud de Hensen d'un embryon de caille au stade 4 (schéma de gauche) est greffé dans l'aire opaque extraembryonnaire (en gris foncé), à la limite externe de l'aire pellucide embryonnaire (en gris clair) d'un embryon hôte de poulet au même stade de développement (figure centrale), un nouvel axe complet incluant le tissu cérébral, se forme au site de l'implantation (embryon de gauche sur la photographie). L'embryon au centre de la photographie s'est formé à partir de la ligne primitive de l'embryon hôte de poulet. Les deux bandes en violet foncé présentes sur les embryons de gauche et du centre indiquent l'expression de Krox20, détectée ici par hybridation *in situ*, qui code un facteur de transcription servant de marqueur du cerveau postérieur. Les cellules de caille se distinguent de celles du poulet par une coloration brun rouge avec un anticorps anti-caille. Bien qu'une partie du tissu du nouvel axe (embryon de gauche) soit formée à partir du greffon de caille, la majorité de l'axe provient de tissus du poulet qui dans des conditions normales ne forment pas d'embryon. Un nœud d'un embryon de caille au stade du repli céphalique (stade 6, schéma de droite) greffé sur un embryon de poulet au stade 4 produit un nouvel axe n'ayant seulement qu'un tronc (embryon de droite sur la photographie) et la majorité du nouveau tissu provient du greffon, comme l'indique la coloration brun rouge.

D'après Stern, C.D. : **Neural induction : old problem, new findings, yet more questions.** Development, 2005, **312 :** 2007-2021.

Gastrula	Gastrula
de xénope	de souris
mésoderme	ateur

	denes exprimes dans rorganisateur	
Gènes codant des	brachyury	brachyury
facteurs de transcription	goosecoid	goosecoid
	nodal-related-3	Nodal
Gènes codant des protéines de sécrétion	chordin, noggin	chordin, noggin
	cerberus	cerberus-related

Fig. 5.16 Gènes exprimés dans l'organisateur de Spemann d'une gastrula de xénope et dans le nœud de la gastrula de souris. Un profil similaire de l'activité génique s'observe entre les deux animaux avec l'expression de gènes homologues. L'expression de certains de ces gènes, tel brachyury, ne se limite pas au seul l'organisateur.

Chez le poulet et la souris, la mise en place du mésoderme axial, produit par la ligne primitive antérieure, dépend de la production des antagonistes du signal BMP par le nœud, tel Noggin, Chordin et d'autres antagonistes tels Cerberus/Cerberus-related1. Le mésoderme axial, comme le mésoderme dorsal chez le xénope et le poisson-zèbre se forme là où le signal BMP est faible. À l'inverse, le mésoderme des lames latérales, produit par la ligne primitive postérieure, résulte de niveaux élevés du signal BMP. De plus, l'organisation de l'axe antéro-postérieur chez le poulet et la souris suit la même règle que chez le xénope et le poisson-zèbre, avec des niveaux élevés du signal Wnt spécifiant les valeurs de position postérieures. La tête se développe là où les signaux Nodal, BMP et Wnt sont bas, et il a été vu chez la souris, comment la spécification des structures antérieures est permise dans l'épiblaste antérieur suite à la production d'antagonistes produits par l'EVA sous-jacent (voir Fig. 5.8). Des embryons de souris mutants négatifs pour Dickkopf1 (Dkk1), antagoniste de Wnt, sont acéphales, ce qui montre que l'inhibition de Wnt est nécessaire pour la formation d'une tête. Cependant, quand Dkk1 est surexprimé chez le xénope, en combinaison avec des inhibiteurs de BMP, il est seulement capable d'induire des têtes surnuméraires. Ceci montre que l'inhibition des deux signaux BMP et Wnt est nécessaire pour imiter l'activité de l'EVA et confirme la similitude fondamentale des conditions de formation de la tête chez la souris et le xénope.

5.7 L'induction neurale chez le poulet et la souris est initiée par un signal FGF suivi d'une inhibition du signal BMP dans un second temps

Comme cela est montré sur la carte des territoires présomptifs de la Fig. 5.9, la région de l'épiblaste de l'embryon de poulet qui donnera la plaque neurale repose immédiatement en avant du nœud. Au moment où les cellules mésodermiques émergent de l'extrémité antérieure de la ligne primitive et s'en éloignent pour former la partie antérieure de la chorde, le processus céphalique, la future plaque neurale qui recouvre celui-ci et qui formera le cerveau, commence à s'épaissir. La ligne primitive amorce alors sa régression, et dans l'épiblaste antérieur le plus éloigné de celle-ci, se forment le repli céphalique et la plaque neurale. Tandis que la ligne continue de régresser, les somites commencent à se former de chaque côté de la chorde (Fig. 5.17). Chez la souris, la plaque neurale se développe de manière similaire à partir de l'épiblaste antérieur par rapport au nœud.

Les signaux émis par le nœud et par l'endomésoderme axial qui commence à s'intérioriser sous l'épiblaste antérieur, sont impliqués dans l'induction des tissus neuraux des embryons de poulet et de souris. Les nœuds de poulet et de souris, quand ils sont greffés sur de jeunes embryons hôtes, induisent un nouvel axe corporel comportant le tissu neural. Ceci prouve que dans un embryon normal, les signaux émis par l'organisateur jouent un rôle dans l'induction de l'ectoderme en tissu neural antérieur. Chez l'embryon de poulet, le tissu neural peut être induit dans l'épiblaste, dans les aires pellucide et opaque, par des greffes de mésoderme de la ligne primitive (voir Fig. 5.15). L'activité inductrice est d'abord localisée dans la partie antérieure de la ligne primitive et dans le nœud de Hensen. Plus tard, lors de la régression de ce dernier (voir Fig. 3.16), son activité devient beaucoup plus réduite et au stade quatre somites, elle a complètement disparu. La compétence de l'ectoderme à répondre aux signaux inducteurs neuraux disparaît au moment de la formation du processus céphalique, ce qui suggère que lors d'un développement normal, l'induction neurale est à ce moment-là achevée.

Le signal FGF est nécessaire pour initier l'induction neurale chez les embryons de poulet et de souris. Chez le poulet, le FGF est tout d'abord produit dans le blastoderme, avant la gastrulation, par le croissant de Koller, et à cette période, il est principalement impliqué dans l'induction mésodermique (voir Fig. 5.4). À ce stade, les cellules épiblastiques sont censées être à l'abri d'une destinée de plaque neurale car les gènes impliqués dans l'induction neurale sont silencieux, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas être stimulés et transcrits. La levée de cette inhibition durant la gastrulation est associée à l'élimination des protéines répressives des sites de régulation de ces gènes et au remodelage de la chromatine sous une forme active par des **complexes de remodelage chromatinien** (Encart 5B). Les cellules épiblastiques qui reçoivent les signaux FGF mais qui n'ont pas formé de mésoderme à ce stade, peuvent alors former la plaque neurale.

Chez l'embryon de poulet, un des gènes clés activé par le signal FGF pour l'induction neurale est *Churchill* qui code un facteur de transcription à doigts de zinc. Quand



l'expression de ce gène est régulée négativement par l'utilisation d'un olignucléotide morpholino antisens (voir Encart 6B), la plaque neurale ne se forme pas. L'activation de *Churchill* résultant du signal FGF conduit indirectement à la répression de gènes caractéristiques du mésoderme et à l'activation du gène du facteur de transcription neural spécifique Sox2, un des plus précoces marqueurs terminaux du tissu neural.

Chez le poulet et la souris, l'inhibition du signal BMP par des antagonistes produits par le nœud et les cellules de l'extrémité antérieure de la ligne primitive, dont Chordin et Noggin, est ensuite requise ultérieurement pour spécifier un devenir neural aux cellules. Comme chez le xénope, le modelage antéro-postérieur de la plaque neurale chez le poulet et la souris dépend aussi d'interactions avec le mésoderme placé sous elle. L'identité des cerveaux antérieur, moyen et postérieur est induite. Chez la souris, l'endomésoderme antérieur en s'étendant sous l'épiblaste antérieur, maintient l'identité du cerveau antérieur qui avait été primitivement spécifiée suite au positionnement de l'endoderme viscéral antérieur venu se placer sous cette région.

L'induction neurale chez les vertébrés est donc un processus complexe comportant plusieurs étapes et les tout premiers stades doivent vraisemblablement se dérouler dans l'épiblaste du poulet et de la souris, ou dans la blastula chez les amphibiens, avant même qu'une région organisatrice ne devienne détectable. Néanmoins, malgré cette complexité, les mécanismes de l'induction neurale chez les vertébrés présentent une similitude fondamentale puisqu'un nœud de Hensen peut induire l'expression de gènes neuraux dans l'ectoderme du xénope (Fig. 5.18). Ceci suggère que se sont conservés d'un point de vue évolutif, les signaux inducteurs et confirme la similitude entre le nœud de Hensen et l'organisateur de Spemann. De plus, de jeunes nœuds induisent l'expression de gènes caractéristiques de structures neurales antérieures d'amphibiens alors que des nœuds plus âgés induisent l'expression typique de structures postérieures. Ces résultats sont en accord direct avec l'hypothèse que suite à un changement de composition des tissus du nœud des vertébrés (voir Section 5.6), des valeurs de position antéro-postérieure différentes sont spécifiées dans la plaque neurale à des moments distincts. Fig. 5.17 Formation de la chorde et du repli céphalique chez l'embryon de poulet. En haut : après un allongement maximal, la ligne primitive commence à régresser vers la région postérieure. Au cours de ce processus, la chorde formée par les cellules qui émergent de l'extrémité antérieure de la ligne primitive et qui migrent vers l'avant, devient apparente (schéma de gauche). Le repli céphalique et la plaque neurale se forment dans la partie antérieure de l'épiblaste jusqu'à la limite la plus éloignée de la ligne primitive. Les bords de la plaque neurale commencent à se soulever pour former les bourrelets neuraux et les premiers somites apparaissent (schéma de droite). En bas : schéma d'une coupe sagittale d'un embryon de poulet au stade proche de la formation du repli céphalique lorsque le nœud de Hensen commence à régresser. La chorde de la région céphalique (le processus céphalique) est formée en avant du nœud, avec une plaque préchordale mésodermique immédiatement placée devant la chorde. Le mésenchyme indifférencié présent de chaque côté de la chorde formera les somites. Le mésoderme somitique antérieur (dans lequel un somite est déjà formé, voir figure du haut, à droite) a été coupé pour montrer la chorde.

ENCART 5B Complexes de remodelage chromatinien

L'expression d'un gène ne dépend pas seulement de la présence de protéines régulatrices spécifiques du gène se liant à l'ADN, mais aussi de l'état de la chromatine, c'està-dire du complexe formé par l'ADN et les protéines constitutives des chromosomes. Ces dernières comportent les histones, qui emballent l'ADN sous forme de structures nommées nucléosomes, et d'autres protéines qui se lient directement à l'ADN ou à des protéines liées à l'ADN et qui affectent la structure de la chromatine et les possibilités de transcription. En termes très simplifiés, l'euchromatine est la chromatine dont l'état permet la transcription des gènes, et



l'hétérochromatine l'état pour lequel les gènes ne sont pas accessibles et « silencieux ».

Dans le cas de l'embryon de poulet, le gène Sox2 est un marqueur précoce de la plaque neurale, mais qui ne s'exprime pas avant la gastrulation, bien que le FGF impliqué dans l'induction de cette plaque y soit actif. Des expériences concernant la régulation de Sox2 effectuées sur des embryons de poulet en culture ont montré que, comme beaucoup d'autres gènes, son expression nécessite l'intervention d'une protéine Brm remodelant la chromatine. Cette protéine possède une activité ATPase et est un constituant essentiel de nombreux complexes multiprotéiques ATP-dépendants du remodelage chromatinien. De tels complexes peuvent être recrutés pour des contrôles régionaux de l'ADN (voir Fig. 1.19) et pourraient utiliser l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour relâcher l'attachement des histones à l'ADN et ainsi permettre aux nucléosomes de glisser le long de celui-ci (Figure 1, flèche supérieure) ou aux histones d'être éliminées (Figure 1, flèche inférieure). Ceci libère les régions de contrôle de l'ADN pour que se fixent d'autres protéines de régulation génique, l'ARN polymérase, et le restant de la machinerie transcriptionnelle, permettant ainsi au gène d'être transcrit.

Les complexes de remodelage chromatinien fonctionnent en liaison avec d'autres protéines de régulation génique. Afin et celui de la plaque neurale. Il est proposé que l'exposition précoce au FGF amorce une expression de *Sox2* en induisant une protéine activatrice qui se lie à la région de contrôle de ce gène en même temps que Brm, mais Sox2 reste inactif suite à la liaison de protéines répressives responsables de l'état hétérochromatinien s'exprimant dans tout l'embryon. L'inhibition est levée par l'expression à un moment défini d'une protéine qui déstabilise le complexe en éliminant les répresseurs et en permettant le fonctionnement de la protéine activatrice, en liaison avec le complexe de remodelage de la chromatine devenu actif, pour déclencher l'expression du gène (Figure 2). La stratégie générale qui consiste à prévenir une expression prématurée d'un gène crucial en présence de signaux potentiels d'activation est probablement largement utilisée au cours du développement.

d'étapes a été proposée rendant compte du passage de Sox2

d'une forme inactive à active entre le stade jeune embryon

Le recrutement sur des sites chromosomiques spécifiques, de complexes de modelage chromatinien et de protéines inductrices de l'hétérochromatine, dépend souvent de modifications chimiques pré-existantes de la chromatine telles la méthylation de l'ADN et la méthylation et l'acétylation d'histones, qui sont évoquées dans l'Encart 8A.

en liaison avec d'autres proteines o de déterminer les effets de protéines candidates pouvant réguler l'expression de *Sox2*, des ADN codant des formes actives ou non de ces protéines, sont transfectés dans l'aire opaque de jeunes embryons de poulet, une zone à l'extérieur de l'embryon qui dans les conditions normales, n'expriment jamais Sox2, pour voir si une induction de l'expression de *Sox2* pouvait être observée. À partir des résultats obtenus, une série





5.8 Les structures axiales de poulet et de souris sont générées à partir d'un auto-renouvellement de populations cellulaires

Chez les embryons de xénope et de poissons, le patron corporel selon l'axe antéro-postérieur se met en place durant la gastrulation. La croissance est limitée et les mouvements de convergence-extension conduisent à une élongation de l'embryon, comme cela a été évoqué dans le Chapitre 9. Les tissus axiaux les plus postérieurs sont ensuite générés à partir d'un bourgeon caudal en croissance. Par contre, chez les embryons de poulet et de souris, bien que l'organisation précoce de l'embryon se fasse aussi au cours de la gastrulation, par exemple celle du cerveau, la majorité de l'axe corporel est générée alors que le nœud et la ligne primitive régressent graduellement, et que l'embryon grossit et s'allonge. Les tissus axiaux qui donnent la moelle épinière, le squelette et la musculature sont mis en place selon une séquence antéro-postérieure par des cellules issues de la ligne primitive et de l'épiblaste voisin.

La régression du nœud et de la région voisine à l'avant de la ligne primitive donne naissance à la chorde et contribue également à celle des somites se formant à partir du mésoderme situé de chaque côté de la chorde. La ligne médiane ventrale du tube neural qui formera la moelle épinière dérive également des cellules de cette région (la plaque neurale qui formera le cerveau a déjà été induite, comme cela fut évoqué précédemment). Les cellules épiblastiques disposées en arc de cercle de chaque côté de la ligne primitive, immédiatement en arrière du nœud donneront la plus grande partie du tube neural et contribueront aussi aux somites du tronc (Fig. 5.19). Ce qui subsiste de la ligne primitive et de l'épiblaste voisin participe à la formation du bourgeon caudal d'où dérive la majeure partie de la région corporelle postérieure. Cette dernière étape de la formation constitue la formation corporelle secondaire et diffère par certains aspects des processus précédents qui forment la tête et le tronc considérés comme une formation corporelle primaire. Ici ne sera décrite que la genèse des tissus axiaux durant la formation corporelle primaire.

Les tissus axiaux qui sont déposés en avant du nœud alors que celui-ci régresse sont formés à partir de cellules de la région comprise entre le nœud et l'arc épiblastique situé de part et d'autre de la ligne primitive immédiatement en arrière du nœud. Les cellules de celui-ci et de la région voisine épiblastique constituent des populations cellulaires s'auto-renouvelant et qui possèdent des propriétés de cellules souches (voir Chapitre 1). L'arc épiblastique a de ce fait été nommé zone souche. Quand des cellules sont marquées individuellement dans cette zone chez des embryons de poulet et de souris, on retrouve certaines de leurs descendantes qui contribuent à l'extension de l'axe cependant que d'autres restent dans cette zone. Des cartes des destinées à long terme montrent que les cellules descendantes de cette zone peuvent former des tissus axiaux sur la quasi-totalité de l'axe antéro-postérieur. De plus, des analyses Fig. 5.18 Le nœud de Hensen d'un embryon de poulet peut induire une expression génique propre au tissu neural dans l'ectoderme du xénope. Différentes zones de l'épiblaste d'un embryon de poulet au stade de la ligne primitive sont placées entre deux fragments de la coiffe animale (ectoderme présomptif) d'une jeune blastula de xénope. Dans l'ectoderme du xénope, l'induction de gènes marqueurs du système nerveux est détectée par la présence de messagers de N-CAM et du facteur neurogénique-3 (NF-3), qui sont spécifiquement exprimés dans le tissu neural d'embryons de xénope au stade 30. Seuls les transplants provenant du nœud de Hensen induisent l'expression de ces marqueurs neuraux dans l'ectoderme du xénope. EF-1a est un facteur de transcription ubiquiste exprimé par toutes les cellules et qui sert ainsi de contrôle).

Illustration d'après Kintner, C.R., Dodd, J. : Hensen's node induces neural tissue in Xenopus ectoderme. Implications for the action of the organizer in neural induction. Development 1991, **113** : 1495-1505. Fig. 5.19 Localisation des populations cellulaires à l'origine de tissus axiaux et para-axiaux durant l'élongation corporelle d'embryons de souris et de poulet. Dans les embryons de souris et de poulet, les tissus axiaux et para-axiaux, chorde, tube neural (moelle épinière) et les somites, se mettent en place progressivement le long de l'axe antéro-postérieur au niveau du tronc, à partir du nœud et de l'épiblaste voisin lorsque le nœud recule postérieurement. Les schémas illustrent des vues dorsales des régions postérieures d'embryons de souris et de poulet à un stade où 6 somites se sont déjà formés ; 24 et 16 somites troncaux restent à s'individualiser, respectivement chez la souris et le poulet. Le tube neural est partiellement clos mais reste encore ouvert dans la région postérieure. Des régions équivalentes chez les embryons de souris et de poulet ont été identifiées qui comportent les populations cellulaires participant à la formation de ces tissus. La chorde troncale qui se met en place est largement constituée de cellules du nœud qui s'auto-renouvellent. Dans le tronc, la quasi-totalité du tube neural et les parties des somites les plus près de la ligne médiane sont générées à partir de populations de cellules s'auto-renouvelant également, et qui sont localisées en arc de cercle dans l'épiblaste, de chaque côté de la ligne primitive juste derrière le nœud. Cette région épiblastique est désignée sous le terme de zone souche (aussi nommée épiblaste caudo-latéral) et les cellules de cette région possèdent les propriétés des cellules souches.

D'après Wilson, V., et al. : **Stem cells, signals and vertebrate body axis extension**. Development 2009, **136** : 1591-1604



détaillées des lignages cellulaires montrent que certaines de ces cellules forment du tissu nerveux alors que d'autres, du mésoderme, plus spécialement la partie médiane des somites qui est la plus proche de la ligne médiane dorsale, ce qui indique que les cellules de cette zone sont multipotentes.

Les autres tissus de l'axe corporel en cours d'extension ne sont pas générés à partir de cette zone souche. Les cellules mésodermiques des parties latérales somitiques et des lames latérales viennent des régions plus postérieures de la ligne primitive et l'endoderme du tube digestif est probablement issu de l'expansion de l'endoderme formé par des cellules qui se sont intériorisées au niveau de la jeune ligne primitive.

Malgré la différence observée dans la mise en place des tissus axiaux du tronc entre le poulet et la souris, d'une part, et le xénope et le poisson-zèbre, d'autre part, les mêmes signaux Wnt et FGF sont impliqués. Des mutations chez la souris de gènes codant des constituants de ces voies de signalisation, par exemple Wnt-3a et le récepteur du FGF, FGFR1, causent une troncature de l'axe. Il a été vu que la cible clé pour les signaux Wnt et FGF est l'expression du gène codant le facteur de transcription Brachyury, le marqueur le plus précoce d'une formation mésodermique. Il est connu depuis longtemps que des mutations spontanées et induites du gène *brachyury* entraînent la troncature de l'axe chez la souris (voir Chapitre 1).

En combinant des signaux Wnt et FGF, les cellules de la région postérieure d'embryons de poulet et de souris maintiennent l'ensemble des cellules proliférantes indifférenciées dans la zone souche. Un gradient antéro-postérieur des signalisations FGF et Wnt se met en place dans la région postérieure de l'embryon avec son niveau le plus élevé à la hauteur du nœud (Fig. 5.20). Le gradient du signal FGF ne résulte pas d'une diffusion. En fait, les cellules du nœud et de la ligne primitive transcrivent le gène *Fgf8* et son messager est graduellement dégradé dans les cellules laissées en arrière au fur et à mesure que la ligne primitive régresse. Le résultat est que les cellules de plus en plus distantes du nœud produisent progressivement moins de FGF-8, ce qui conduit à ce qu'un gradient soit généré pour ce signal.

Il existe aussi un gradient d'une petite molécule signal sécrétée, l'acide rétinoïque (Encart 5C) qui est en sens inverse de celui du FGF et qui a un effet antagoniste sur l'action du FGF. L'acide rétinoïque est synthétisé par des cellules mésodermiques somitiques et diffuse vers la région postérieure. Les cellules postérieures produisent l'enzyme Cyp26a1 qui métabolise l'acide rétinoïque, ce qui maintient la signalisation acide rétinoïque à un faible niveau dans les cellules de la zone souche. Les embryons de souris dont le gène *Cyp26a1* est non fonctionnel ont des troncatures axiales comme les embryons de souris traités avec un excès d'acide rétinoïque. L'expression de *Cyp26a1* est régulée par la signalisation FGF, et donc les formations de ces gradients opposés sont interdépendantes.

Conformément aux résultats issus des analyses détaillées des lignages cellulaires évoquées précédemment, la population cellulaire de la zone souche des embryons de

poulet et de souris exprime des gènes qui sont caractéristiques à la fois du tissu neural précoce (*Sox2*) et du mésoderme para-axial précoce (*brachyury*). Quand les cellules quittent la zone souche, elles sont progressivement exposées à des niveaux du signal FGF qui s'abaissent et inversement à des niveaux du signal acide rétinoïque qui augmentent, et ceci provoque leur différenciation en tissu neural de la moelle épinière (dans le cas de cellules ectodermiques) et en mésoderme para-axial (dans le cas de cellules mésodermiques), lequel se segmente en somites.

Les axes corporels de souris et de poulet sont complétés par la formation des structures les plus postérieures à partir du bourgeon caudal qui se développe quand, chez ces espèces, sont respectivement formés 30 et 22 somites. À ces stades, l'organisation corporelle finale a émergé et les embryons de poulet et de souris ressemblent fortement à ceux des grenouilles et des poissons (voir Fig. 3.2). L'établissement du plan corporel a aussi fixé les positions dans lesquelles les différents organes se développeront, même si aucun indice de leur formation n'est encore décelable. Néanmoins, de nombreuses expériences de greffe ont montré que le potentiel à former un organe donné est maintenant confiné dans des régions spécifiques de l'embryon. Chacune de ces régions a cependant une capacité de régulation considérable, ce qui fait que si une partie d'une région est éliminée, une structure normale peut encore se former.

RÉSUMÉ

Le développement précoce du poulet est affecté par la grande quantité de vitellus dans l'œuf et les causes de la rupture initiale de symétrie est inconnue. Chez la souris, le développement précoce génère des populations cellulaires qui formeront des tissus extra-embryonnaires, et l'existence de facteurs cytoplasmiques maternels entraînant des différences entre cellules n'est pas prouvée. Des ensembles organisés de types cellulaires distincts chez des embryons précoces de souris résultent d'une spécification des cellules en fonction de leur position et de leur ségrégation. La masse cellulaire interne de l'embryon de souris est à l'origine de toutes les cellules du corps, et des cellules souches pluripotentes, les cellules souches embryonnaires, peuvent en être isolées et cultivées. Comme chez le xénope et le poisson-zèbre, la localisation de la signalisation Wnt et de ses antagonistes détermine la position où l'organisateur se formera dans les embryons de poulet.

La spécification des feuillets embryonnaires se déroule pendant la gastrulation chez le poulet et la souris, donc plus tardivement que chez le xénope et le poisson-zèbre, et nécessite des interactions intercellulaires. Chez tous les embryons de vertébrés, Nodal est impliqué dans la spécification de l'endoderme et du mésoderme et fournit une information de position mésodermique. Le nœud de Hensen chez le poulet a un rôle similaire de celui de l'organisateur de Spemann et peut instaurer un nouvel axe antéro-postérieur. Le nœud de souris peut lui aussi induire la formation d'un nouvel axe mais dépourvu de tête, cette dernière nécessitant une exposition préalable de l'épiblaste à l'endoderme viscéral antérieur.

Les organisateurs des quatre embryons modèles de vertébrés produisent et sécrètent des antagonistes de molécules de signalisation, ce qui génère des gradients conférant aux cellules embryonnaires une information de position. Les spécifications ventrale et dorsale sont respectivement associées à un niveau élevé et faible du signal BMP. De même, les spécifications postérieure et antérieure résultent respectivement d'un niveau élevé et faible du signal Wnt. La tête se forme là où les signaux BMP, Wnt et Nodal sont faibles. Chez le poulet et la souris, le système nerveux antérieur, qui se met en place à partir de la plaque neurale, est induit par la signalisation FGF. Comme chez le xénope, l'inhibition du signal BMP par des protéines telles que Chordin et Noggin produites par l'organisateur, est nécessaire lors de stades plus tardifs. L'organisation de la plaque neurale requiert des signaux d'origine mésodermique présentant à la fois des différences quantitatives et qualitatives, des niveaux élevés de Wnt et FGF spécifiant les structures les plus postérieures. Chez le poulet et la souris, la moelle épinière et les somites sont générés à partir de populations cellulaires s'auto-renouvelant. Localisées dans la zone du nœud et les zones souches, celles-ci sont maintenues par les signaux Wnt et FGF.



Fig. 5.20 Les gradients de FGF et d'acide rétinoïque contrôlent la mise en place des tissus axiaux à partir de la zone souche chez les embryons de souris. Ce schéma montre une vue dorsale de la moitié postérieure d'un embryon de souris au stade E8,5 avec ses 6 dernières paires de somites formées. Le tube neural formant la moelle épinière est fermé dans sa région antérieure, et les neurones se sont différenciés. FGF et Wnt forment chacun un gradient antéropostérieur dans l'embryon, leur niveau le plus élevé se situant à la hauteur du nœud. Produits par les cellules du nœud et de la zone souche, la combinaison de leurs signaux est à l'origine du maintien des populations de cellules indifférenciées s'auto-renouvelant. Le gradient FGF est généré par la dégradation graduelle des ARNm Fgf par les cellules quittant en avant la zone souche. Ceci se traduit par un gradient de la protéine FGF se modifiant de manière continue postérieurement au fur et à mesure que l'embryon s'allonge. L'acide rétinoïque synthétisé et sécrété par les somites nouvellement formés est présent sous la forme d'un gradient opposé à celui du FGF (flèches en vert dégradé) et exerce un rôle antagoniste vis-à-vis de ce dernier. Des gradients opposés similaires pour les signaux FGF/Wnt et l'acide rétinoïque sont présents chez l'embryon de poulet et exercent les mêmes rôles pour la mise en place des tissus axiaux.

ENCART 5C L'acide rétinoïque : une petite molécule signal intercellulaire

L'acide rétinoïque est une petite molécule diffusible dérivée de la vitamine A (rétinol), celle-ci étant d'origine alimentaire chez les animaux. Il est connu depuis longtemps, par des travaux sur les porcs, qu'un déficit ou un excès de cette vitamine pouvait conduire à des défauts du développement. Ainsi, des nouveau-nés porteurs de malformations cranio-faciales sont nés de mères qui avaient suivi un traitement utilisant des dérivés synthétiques de la vitamine A pour soigner des maladies de peau sévères alors qu'elles ignoraient qu'elles étaient enceintes.

Le rétinol est présent à taux élevé dans les œufs de poule et est amené aux embryons de mammifères par la circulation maternelle. Le rétinol se lie à des

protéines porteuses dans l'espace intercellulaire et est transféré dans les cellules par un récepteur transporteur, le STRA6 (pour *Stimulated by retinoic acid 6*). À l'intérieur de la cellule, le rétinol se lie à une protéine intracellulaire CRBP (pour *Cellular Retinol Binding Protein*). L'acide rétinoïque est produit en deux étapes (Figure 1) : le rétinol est d'abord métabolisé en rétinaldéhyde par des rétinol déshydrogénases (principalement RDH10) ou l'alcool déshydrogénase (ADH), puis le rétinaldéhyde est transformé en acide rétinoïque par des rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH). Il existe chez les vertébrés trois RALDH codées par les





gènes *Raldh-1, -2 et -3*, et chez les embryons de vertébrés, l'expression de ces gènes est étroitement contrôlée tant sur le plan temporel que spatial, ce qui permet la production de l'acide rétinoïque dans des sites très précis et à des moments spécifiques lors du développement.

L'acide rétinoïque est détruit par les enzymes du système cytochrome P450, essentiellement par les membres de la sous-famille des enzymes CYP26 qui, comme les RALDHs, ont des profils d'expression très précis chez l'embryon. Des mécanismes tampons homéostatiques intriqués, impliquant la régulation des gènes codant les enzymes métabolisant l'acide rétinoïque et des

ÉSUMÉ : détermination des axes chez les vertébrés		
	Axe dorso-ventral	Axe antéro-postérieur
Xénope	Le point d'entrée du spermatozoïde et la rotatior corticale mènent à la spécification du côté dorsal opposé au point d'entrée du spermatozoïde. La localisation des messagers maternels <i>wnt11 et wnt5a</i> et la β-caténine nucléaire spécifient le côte dorsal et la position de l'organisateur	n Spécifié dans l'organisateur , (organisateur de Spemann) t é
Poisson-zèbre	 Les événements conduisant à la rupture de la symétrie initiale sont inconnus. La localisation de messagers maternels wnt8a et la β-caténine nucléaire spécifient le côté dorsal et la position de l'organisateur 	Spécifié dans l'organisateur (l'écusson)
Poulet	La zone marginale postérieure spécifie l'extrémité ventrale de l'axe dorso-ventral la	La gravité détermine la position de a zone marginale postérieure et ainsi l'extrémité postérieure de l'axe antéro-postérieur
Souris	Interaction entre la masse cellulaire interne et le trophectoderme	Spécification et mouvement de l'endoderme viscéral antérieur

processus de rétroaction par des produits terminaux permettent de maintenir l'acide rétinoïque à des taux appropriés. Si les taux augmentent, l'expression des gènes *Raldh* se réduit et celle des gènes *Cyp26* augmente, et inversement, si les taux d'acide rétinoïque baissent.

L'acide rétinoïque agit comme une molécule signal intercellulaire comme le montre la figure, mais il agit aussi probablement comme signal dans les cellules qui le produisent. L'acide rétinoïque est liposoluble et peut ainsi traverser les membranes cellulaires. Dans la cellule, il se lie à des protéines qui le transportent jusqu'au noyau où il se fixe à des récepteurs qui agissent directement comme des régulateurs transcriptionnels. Les mammifères et les oiseaux possèdent trois récepteurs nucléaires RAR (pour *Retinoic Acid Receptor*), $-\alpha$, $-\beta$ et $-\gamma$, qui agissent sous forme dimérique en se combinant avec des protéines réceptrices RXR (pour Retinoid X Recepteur) présentes également sous trois formes - α , - β et - γ . En l'absence d'acide rétinoïque, les récepteurs hétérodimériques RAR/RXR sont fixés à des séguences régulatrices de l'ADN nommées RAREs (pour Retinoic Acid Response Elements) et répriment les gènes assujettis à ces séquences. La fixation de l'acide rétinoïque à son récepteur nucléaire conduit à l'activation du gène associé à l'élément de réponse. L'activation d'un gène par l'acide rétinoïque peut entraîner non seulement sa transcription directe mais aussi le recrutement de protéines co-activatrices responsables d'un remodelage chromatinien, qui permet au gène de s'exprimer (voir Encart 5B).

Parmi les gènes possédant un élément réponse à l'acide rétinoïque, se trouve le gène codant RARb, et ainsi l'expression de ce gène constitue une réponse directe à l'acide rétinoïque. Cette expression peut, pour cette raison, être utilisée comme un indicateur d'un signal acide rétinoïque, et des souris transgéniques ont été produites avec le gène rapporteur *lacZ* (codant pour la β -galactosidase, voir Encart 1D) rattaché à l'élément de réponse à l'acide rétinoïque du gène *RARb*. La β -galactosidase peut être mise en évidence dans les embryons et tissus par une coloration histochimique donnant une coloration bleue, et permet de révéler quelles cellules ont répondu au signal acide rétinoïque. La Figure 2 montre un embryon de souris au stade E9,5 coloré par cette méthode.

D'autres signaux importants du développement peuvent agir par le biais de récepteurs intracellulaires de la même superfamille que les protéines RAR et RXR. Ce sont les hormones stéroïdes (tels que l'œstrogène et la testostérone, évoqués dans les Chapitres 10 et 13) et les hormones thyroïdiennes (thyroxine et tri-iodothyroxine, examinées au Chapitre 13). Comme l'acide rétinoïque, ces molécules sont liposolubles, diffusent librement à travers la membrane plasmique et se lient à des protéines réceptrices intracellulaires. Le complexe ligand/récepteur est ensuite capable d'agir en tant que régulateur transcriptionnel, en se fixant directement à des éléments de réponse de l'ADN pour activer (ou parfois réprimer) simultanément la transcription de plusieurs gènes.



Figure 2

Photographie aimablement communiquée par Pascal Dollé d'après Ribes, V., et al. Rescue of cytochrome P450 oxidoreductase (Por) mouse mutants reveals functions in vasculogenesis, brain and limb patterning linked to retinoic acid homeostasis. Dev. Biol. 2007, 303 : 66-81.

Formation des somites et organisation antéro-postérieure

Le mésoderme para-axial situé de chaque côté de la chorde se segmente pour former des blocs tissulaires nommés somites. Ceux-ci sont formés séquentiellement selon une direction antéro-postérieure et sont à l'origine des structures osseuses et cartilagineuses axiales de la colonne vertébrale, de muscles squelettiques et du derme cutané dorsal. Dans les régions où se forment les membres, les cellules myogéniques pour la musculature de ces derniers sont fournies par les somites (voir Chapitre 11).

Comme il a été vu précédemment, les cellules mésodermiques présentes le long de l'**axe médio-latéral** d'un somite (l'axe latéral parallèle à la ligne médiane de l'embryon et passant par les parties somitiques les plus proches de cette ligne) proviennent de différents sites le long de la ligne primitive et se rassemblent pendant la gastrulation chez l'embryon de poulet (voir Fig. 5.13). Les cellules de la partie médiane somitique proviennent de la zone souche tandis que celles de la partie latérale sont issues d'une région légèrement postérieure de la ligne primitive. Le niveau de la signalisation BMP-4 structure le mésoderme médiolatéral : il est élevé pour le mésoderme des lames latérales et moins élevé pour le mésoderme pré-somitique. La plus faible signalisation BMP requise pour la formation des somites est montrée par le fait que l'inhibition de la signalisation BMP par Noggin est suffisante pour convertir le mésoderme des lames latérales en somites.



Fig. 5.21 Les somites se forment par

paire à partir du mésoderme para-axial. Les somites sont des blocs tissulaires transitoires qui se forment à partir du mésoderme paraaxial s'étendant de chaque côté de la chorde. Ils se mettent en place selon une direction antéro-postérieure à partir du mésoderme présomitique non segmenté. La région médiane de chaque somite provient d'un ensemble de cellules souches localisées près du nœud, et la région latérale, de cellules issues des régions plus postérieures de la ligne primitive. Les cinq premières paires de somites sont à l'origine de la partie postérieure de la boîte crânienne ; les autres paires restantes constituent les muscles et les os du tronc et de la queue ainsi que les muscles des membres.



La nature métamérisée des somites est partagée par d'autres éléments corporels des vertébrés tels le système nerveux, les nerfs rachidiens et les ganglions du tronc (voir Chapitre 9), et le système vasculaire. De plus, le mésoderme para-axial est soumis à une information de position due à l'expression des gènes Hox, et ceci détermine son identité régionale le long de l'axe antéro-postérieur corporel. Celle-ci a pour conséquence la formation de structures appropriées aux places idoines. Par exemple, les vertèbres ont des morphologies caractéristiques selon leurs sites de formation le long de la colonne vertébrale. Dans un premier temps seront examinés la mise en place des somites, la manière dont est contrôlée leur formation, et ce qui détermine leur nombre chez différents organismes. Sera considéré ensuite le rôle des gènes Hox dans la spécification des différentes identités régionales le long de l'axe antéro-postérieur. Puis pour finir, la spécification des régions somitiques et les tissus qui en sont issus seront examinés.

5.9 Les somites sont formés selon un ordre bien défini le long de l'axe antéro-postérieur

Beaucoup de travaux relatifs à la somitogenèse ont été menés sur des embryons de poulet car ce processus peut être facilement observé chez ces derniers, et c'est pourquoi le poulet sera ici l'organisme modèle principal choisi. Cependant seront évoqués aussi des travaux concernant le poisson-zèbre et la souris qui grâce à des analyses génétiques permettent d'identifier les constituants moléculaires sous-jacents au processus.

Chez l'embryon de poulet, la majorité du mésoderme para-axial antérieur ne se segmente pas et donne certains muscles de la face, dont les muscles oculaires. La formation des somites se réalise de chaque côté de la chorde en débutant dans le mésoderme para-axial juste en arrière du cerveau postérieur. Les somites sont formés en avant du nœud de Hensen en cours de régression (Fig. 5.21). Les cinq premiers somites participent à la partie la plus postérieure du crâne, le restant de celui-ci ayant pour origine les crêtes neurales. Ils contribuent également à la formation de quelques muscles de la tête et du cou. Les douze somites suivants (somites 6-19) sont à l'origine des vertèbres cervicales, les somites 20 à 26 donnent les vertèbres dorsales et les 14 autres restant, les vertèbres lombo-sacrées et caudales. Le processus de la formation de somites ou somitogenèse a lieu simultanément avec l'expansion du mésoderme pré-somitique postérieur, qui est très fortement liée à la prolifération des cellules multipotentes de la population en auto-renouvellement de la zone souche décrite précédemment.

La formation des somites se réalise dans une direction antéro-postérieure au sein du mésoderme insegmenté, le **mésoderme pré-somitique**, qui s'étend entre le dernier somite formé et le nœud. Comme cela a été vu chez le poulet et la souris, Section 5.8, les cellules mésodermiques issues de la zone souche rejoignent le mésoderme pré-somitique au fur et à mesure que le nœud recule. De ce fait, la taille de ce mésoderme reste plus ou moins constante. Les somites sont formés par paires, un de chaque côté de la chorde, les deux somites d'une même paire s'individualisant simultanément. Une paire de somite se forme toutes les 90 minutes chez le poulet, 120 minutes chez la souris, 45 minutes chez le xénope, 30 minutes chez le poisson-zèbre et 6 heures chez l'espèce humaine.

L'individualisation des somites à partir des cordons mésodermiques pré-somitiques implique une disjonction tissulaire et des mouvements cellulaires ainsi qu'une incorporation de cellules au niveau des limites somitiques antérieures et postérieures. Comme souvent dans le cas du développement, les processus impliqués varient selon les espèces, même si sont utilisés les mêmes outils moléculaires. La formation d'un somite à partir du mésoderme pré-somitique nécessite une **transition mésenchymato-épithéliale** au cours de laquelle les cellules mésenchymateuses mésodermiques plus ou moins éparses adhèrent fortement les unes aux autres pour constituer une structure épithéliale.

Chez le xénope, la segmentation se réalise suite à la formation d'une fissure, le sillon inter-somitique, dans le mésoderme pré-somitique qui sépare deux blocs cellulaires de taille convenable qui ensuite réalisent une rotation de 90°. Chez le poisson-zèbre, le sillon s'allonge selon une direction médio-latérale, et chez le poulet et la souris,

il n'y a pas de sillon, la formation des somites semblant impliquer un remaniement cellulaire qui conduit à une séparation de type articulaire (Fig. 5.22). Une signalisation Notch depuis la région la plus antérieure du mésoderme pré-somitique semble être importante pour que s'effectue cette séparation. La transition mésenchymato-épithéliale nécessite des modifications coordonnées des cytosquelettes cellulaires, des jonctions adhérentes liant les cellules entre elles (évoquées dans le Chapitre 9) et de la matrice extracellulaire, et il est probable que les forces générées durant la transition contribuent également à l'isolement somitique.

La précision avec laquelle chaque somite s'individualise à partir du mésoderme pré-somitique suggère que le nombre de cellules dans chaque somite, et ainsi sa taille, est déterminée dans le mésoderme pré-somitique. Des expériences chez l'embryon de poulet montrent que c'est le cas, dans la mesure où le déroulement de la formation des somites dans la région non segmentée n'est pas affecté par des sections transversales effectuées dans le cordon mésodermique pré-somitique. Ceci suggère que la formation des somites est un processus autonome et qu'aucun signal extracellulaire spécifiant une localisation antéro-postérieure ou le déroulement temporel n'est impliqué. Même si une partie du mésoderme non segmenté subit une rotation de 180°, chaque somite se formera au bon moment, mais la séquence de la formation se fera dans une direction inverse de la normale dans le tissu inversé (Fig. 5.23). Ceci montre qu'un patron moléculaire spécifiant le moment de formation de chaque somite est établi avant que les somites ne commencent à se former dans le mésoderme pré-somitique, processus qui sera rediscuté plus loin. L'existence de ce patron étant acquise, l'identité future de chaque somite doit également être liée à l'ordre temporel suivant lequel ses cellules intégraient le mésoderme pré-somitique. La détermination d'une séquence spécifique de la somitogenèse se produit à un certain niveau du mésoderme pré-somitique. Si une zone de mésoderme postérieur à ce niveau est retournée, celle-ci sera l'objet d'une régulation permettant de former des somites selon la séquence normale.

L'opinion des biologistes du développement à propos de la métamérisation corporelle des vertébrés a été largement guidée par un modèle très fructueux, celui de l'horloge et du front de détermination. Ce modèle a été proposé avant l'arrivée de la biologie moléculaire pour rendre compte de l'apparition périodique et spatialement organisée des somites. C'est un modèle établi au niveau tissulaire qui propose que la taille d'un somite est définie par la distance parcourue par une onde de détermination depuis la région antérieure vers la région postérieure pendant un temps d'oscillation





Fig. 5.22 Formation des somites chez le xénope, le poisson-zèbre et le poulet. Les flèches indiquent la direction selon laquelle s'effectue la séparation au sein du tissu au moment où se forment les somites. Les lignes pointillées représentent les futures limites des somites.

Fig. 5.23 L'ordre de la formation des somites dans le temps est spécifié précocement au cours du développement embryonnaire. La formation des somites se réalise chez le poulet selon une direction antéro-postérieure. Les somites se forment d'une manière séquentielle dans le mésoderme pré-somitique, entre le dernier somite individualisé et le nœud de Hensen qui recule vers la région postérieure. Si le mésoderme pré-somitique subit une rotation de 180°, inversant son axe antéro-postérieur, comme le montre la flèche, l'ordre temporel selon lequel les somites se forment n'est pas affecté, le somite 6 s'individualisant encore avant le somite 10.

d'une « horloge » fonctionnant dans le mésoderme (Fig. 5.24). L'observation de l'expression périodique du gène *hairy-1* durant la somitogenèse chez les embryons de poulet a apporté la première preuve moléculaire de l'existence de cette horloge. La période des oscillations équivaut au temps nécessaire pour qu'une paire de somites se forme (par exemple 90 min chez le poulet) et ainsi ces oscillations de l'expression génique furent suggérées être l'horloge moléculaire qui dirige la segmentation. Par la suite, beaucoup d'autres gènes se sont avérés s'exprimer de façon périodique dans le mésoderme pré-somitique.

Le modèle de l'horloge et du front de détermination propose que lorsque des cellules dans le mésoderme pré-somitique ont été atteintes par l'onde de détermination, elles reçoivent un signal de l'horloge sous la forme d'une expression génique oscillante, ce qui les engage à former un somite (voir Fig. 5.24).

La position du front de détermination est spécifiée par les niveaux des signaux FGF et Wnt, présents dans le mésoderme pré-somitique sous la forme de gradients décroissants depuis la région postérieure vers la région antérieure (voir Section 5.8 et Fig. 5.24). La formation somitique se produit pour un niveau de la signalisation FGF/Wnt tombant en deçà d'un certain seuil. Comme les gradients FGF/Wnt se déplacent postérieurement au fur et à mesure que s'allonge le mésoderme pré-somitique où les somites se segmenteront. Les positions où ces somites se forment sont spécifiées par le passage du front de détermination, peu de temps avant que la segmentation ne se produise effectivement (Fig. 5.25). Le gradient d'acide rétinoïque qui s'étend dans une direction opposée a un effet antagoniste sur l'action du FGF et évite que la région pré-somitique ne devienne sans cesse plus longue.



Fig. 5.24 Modèle de l'horloge et du front de détermination pour la formation des somites. Deux cycles de spécification somitique sont illustrés ici. L'acide rétinoïque (en vert) produit par les somites forme, dans le mésoderme, un gradient s'étendant depuis la région antérieure (A) vers la région postérieure (P) et rencontre un gradient de FGF/Wnt (en orangé) de sens opposé au précédent. Un front de détermination somitique (en rouge), spécifié par un niveau de seuil de la signalisation FGF/Wnt, progresse à travers le mésoderme dans une direction antéropostérieure pendant que le mésoderme s'allonge. Dans le même temps, les cycles d'expression génique (la séquence d'expression d'un gène est illustrée en violet) balaient le mésoderme dans le sens postéro-antérieur. Par souci de clarté, l'expression génique cyclique n'est représentée que dans la partie mésodermique gauche. Au cours de chaque cycle, une nouvelle paire de somites est spécifiée (rectangle noir, montré que dans la partie droite du mésoderme) au sein du mésoderme qui a été mis en présence du signal de détermination et de l'expression génique cyclique. L'expression génique caractéristique d'un somite préformé se manifeste, suivie finalement, par la segmentation et la différenciation de celui-ci. Les somites spécifiés lors des cycles précédents, mais n'étant pas encore différenciés, sont représentés dans les régions mésodermiques antérieures (plus de détails sont montrés dans la Fig. 5.25).

D'après Gomez, C., Pourquié, O. : Developmental control of segment numbers in vertebrates. J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 2009, 312 : 533-544. Le modèle de l'horloge et du front de détermination apporte une explication aux résultats concernant les retournements à différents endroits de parties de mésoderme pré-somitique. Si la partie retournée provient du mésoderme pré-somitique que le front de détermination a déjà parcouru, les somites qui se forment seront inversés par rapport à l'axe antéro-postérieur (voir Fig. 5.23) ; si elle vient d'une région que le front de détermination n'a pas encore atteinte, une régulation est susceptible de s'exercer.

Il y a maintenant une grande liste de gènes dont l'expression oscille durant la somitogenèse ; la plupart d'entre eux sont associés à des signalisations Wnt, Notch et FGF. Leur profil d'expression est toujours le même : une onde qui balaie le tissu depuis la zone postérieure du mésoderme pré-somitique vers sa zone antérieure, où les somites vont se former (voir Fig. 5.24). Il est important de saisir que ce qui se déplace est l'onde d'expression génique et non les cellules qui expriment les gènes. En d'autres termes, à chaque cycle d'expression génique, chaque cellule du mésoderme pré-somitique exprime un gène donné pendant une période donnée et ensuite s'arrête.

L'expression cellulaire génique est au début autonome et synchronisée localement par une certaine forme de communication intercellulaire, ce qui fait que l'onde d'expression génique se déplace antérieurement et aussi que les cellules d'un somite spécifié sont toutes dans un même état et prêtes à entrer ensemble en différenciation. Cette onde rencontre le front de détermination et puis s'arrête à la limite où les somites commencent à se former. L'expression génique propre à un somite programmé est enclenchée et la segmentation ainsi que la différenciation s'ensuivent. L'expression génique cyclique devient restreinte à la moitié antérieure de chaque somite nouvellement formé, où elle persiste un temps avant de disparaître. Ensuite le cycle démarre de nouveau avec une nouvelle vague d'expression s'initiant dans la partie postérieure du mésoderme pré-somitique.

L'idée que les oscillations géniques sont liées à la formation des somites s'appuie sur l'observation d'une synchronisation temporelle d'événements spatialement limités, et sur les études de mutations de gènes oscillants. Par exemple Lunatic fringe et Delta-like1 (deux gènes impliqués dans la signalisation Notch, voir Encart 5D) chez la souris, et leurs gènes homologues chez le poisson-zèbre, entraînent des segmentations défectueuses. D'autres gènes de la voie Notch, tel que Notch1 (qui code la protéine du récepteur Notch lui-même), sont exprimés dans le mésoderme pré-somitique selon un mode non cyclique, bien que la formation du domaine intracellulaire clivé de Notch, marqueur de la signalisation Notch, ait été observée quand la vague se déplaçait, révélant une signalisation Notch cyclique. Utilisant ces observations, un oscillateur peut être construit à partir d'une simple boucle d'autorégulation de l'expression génique avec un temps de délai qui est crucial pour générer l'oscillation. Il est ainsi possible de voir comment ces gènes pourraient créer les oscillations de base qui pilotent le déroulement de la segmentation. Cependant, où et comment les oscillations peuvent être transmises depuis le niveau cellulaire à celui du tissu lorsque le processus de segmentation est en cours, restent encore à l'étude.

Il existe des preuves établies à partir du poisson-zèbre et de la souris que la toute première étape importante de la synchronisation des oscillations géniques entre cellules voisines est sous la dépendance de la signalisation Delta-Notch. Des mutants de la voie de signalisation Notch montrent des interruptions dans le processus de segmentation associées à une perte de la synchronisation, plutôt qu'une perte des oscillations au niveau individuel cellulaire. Chez les embryons de souris chez lesquels la signalisation Delta-Notch est laissée active ou est abolie entièrement, les somites se forment rarement, ou s'ils se forment, ils varient en taille et en forme et sont différents de chaque côté du corps. De plus, la signalisation Notch contrôlée expérimentalement a clairement montré une corrélation entre la signalisation Notch et la mise en place du patron périodique et de l'apparition des somites.

Néanmoins, la manière dont les gènes de l'horloge contrôlent la périodicité de cette horloge reste obscure ; il pourrait exister une redondance importante entre les divers constituants de l'horloge, et l'information issue des différents vertébrés est parfois contradictoire. Comment l'horloge somitique se met en route et comment elle s'arrête demeurent également inconnus.

La signalisation Notch est aussi impliquée dans la détermination d'une frontière à l'intérieur des somites. Ceux-ci sont fonctionnellement divisés en moitiés antérieure et postérieure possédant des devenirs différents, et chez la souris, la signalisation



Fig. 5.25 Les somites sont spécifiés peu de temps avant qu'ils ne se différencient et se segmentent à partir du mésoderme. La paire de somites spécifiée le plus récemment est représentée par des rectangles noirs. I, somites les plus récemment formés ; 0, somites en cours de formation ; -I, -II, -III, blocs cellulaires qui ont été spécifiés et qui formeront les somites lors des cycles successifs. Comme il est indiqué dans la Fig. 5.24, le site de formation des somites est spécifié par les niveaux de seuil de FGF/ Wnt (en orangé), et de l'acide rétinoïque (en vert), ceux-ci formant des gradients opposés au sein du mésoderme. A, antérieur ; P, postérieur.

D'après Gomez, C., Pourquié, O. : Developmental control of segment numbers in vertebrates. J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 2009, **312** : 533-544.

ENCART 5D La voie de signalisation Notch

Les protéines transmembranaires de la famille Notch agissent comme des récepteurs et sont à l'origine de la voie de signalisation intracellulaire Notch. Celle-ci est impliquée dans de nombreuses décisions au cours du développement qui déterminent des destinées cellulaires, allant des précurseurs neuronaux chez la drosophile et les vertébrés à la différenciation des cellules épidermiques de la peau chez les mammifères. Les ligands de Notch sont aussi des protéines membranaires et c'est pourquoi la signalisation Notch nécessite un contact intercellulaire. Ceci signifie que la voie de signalisation Notch peut, au sein d'une population cellulaire, être activée au niveau d'une seule cellule, et que celle-ci peut avoir un devenir différent de celui des



Figure 1

cellules qui l'entourent. Des exemples seront décrits avec le cas du développement de l'œil de drosophile dans le Chapitre 11 et de la spécification des neuroblastes au Chapitre 12.

Les ligands qui se fixent à Notch sont des membres des familles Delta et Serrate/Jagged1. La fixation du ligand sur une cellule contiguë exprimant Notch initie une transduction de signal intracellulaire à partir du site récepteur. Notch possède un grand domaine extracellulaire comportant plusieurs sites de glycosylation qui sont spécifiquement modifiés par des glycosyltransférases, dont celles de la famille Fringe qui comporte Lunatic Fringe (Figure 1). La glycosylation module la signalisation Notch en affectant la capacité du domaine extracellulaire à se lier à différents ligands, facilitant ainsi la fixation des ligands Delta tout en restreignant celle des ligands Serrate.

L'activation de Notch par ses ligands entraîne le clivage enzymatique de son domaine intracellulaire et sa translocation vers le noyau où il se fixe en l'activant sur un facteur de transcription de la famille CSL (CSL a été nommé d'après les facteurs de transcription activés par Notch : CBF1/RBPkj chez les mammifères, le suppresseur de Hairless (Su(H)) chez la drosophile et LAG-1 chez C. elegans). En l'absence de la signalisation Notch, CSL est retenu dans un complexe contenant des protéines de répression. L'activation du complexe CSL par la fixation du domaine intracytoplasmique de Notch entraîne la libération des répresseurs et le recrutement de la protéine co-activatrice Mastermind ainsi que d'autres co-activateurs. Le résultat de l'activation de la voie de signalisation Notch est la transcription de gènes spécifiques. La signalisation Notch est très polyvalente, et son activation chez différents organismes et dans diverses circonstances durant le développement, permet de déclencher ou d'inhiber l'expression d'un large éventail de gènes différents.

Notch semble requise suite à sa possible fonction d'horloge pour établir cette limite antérieure-postérieure.

Une question importante concernant le développement est de savoir ce qui détermine le nombre final de somites. Celui-ci est hautement variable entre les différentes espèces de vertébrés : oiseaux et humains en ont autour de 50 cependant que les serpents en ont plusieurs centaines. Le nombre total de somites pourrait être déterminé par la taille du mésoderme pré-somitique disponible pour les former. Cette taille dépend *in fine* de l'importance de l'allongement de l'axe antéro-postérieur, et celle-ci varie entre les embryons ayant un petit nombre de somites et ceux en ayant un nombre important.

Un plus grand nombre de somites pourrait aussi être généré à partir d'une même longueur de mésoderme pré-somitique si chaque somite était plus petit. Ceci pourrait se faire avec une horloge plus rapide qui ferait que davantage de somites, de taille plus réduite, seraient formés pour une période de temps et une longueur de mésoderme pré-somitique données. Sinon, le rythme de l'horloge pourrait être



Animation de la voie de signalisation Notch



Fig. 5.26 Le mésoderme pré-somitique a acquis une valeur de position avant que ne se forment les somites. Le mésoderme présomitique qui sera à l'origine de vertèbres thoraciques est greffé dans une région antérieure d'un plus jeune embryon où se développeraient normalement des vertèbres cervicales. Le mésoderme greffé évolue selon sa position d'origine et des côtes se forment dans la région cervicale de l'hôte.

conservé à l'identique et la progression du front de détermination ralentie, ce qui conduirait à ce que davantage d'oscillations de l'horloge se produisent sur une longueur du mésoderme pré-somitique avant que les cellules ne deviennent déterminées pour former un segment.

Des expériences chez des embryons de poulet ont montré qu'une signalisation FGF augmentée transitoirement dans le mésoderme pré-somitique, en modifiant la forme du gradient FGF et en réduisant la vitesse de progression du front de détermination, provoque la formation de somites plus petits. Les serpents des blés (*Pantherophis guttatus*) ont 260 somites dont la taille est le tiers de celle des somites de poulet et de souris, et ceci semble être dû à une accélération du rythme d'oscillation de l'horloge, raccourcissant ainsi le temps mis pour qu'un somite se forme.

Les somites se différencient en structures para-axiales particulières en fonction de leur position le long de l'axe antéro-postérieur. Les structures dérivées des somites les plus faciles à identifier sont les vertèbres. Les somites les plus antérieurs contribuent à la région la plus postérieure du crâne, ceux postérieurs à ces derniers forment les vertèbres cervicales et ceux encore plus postérieurs développent les vertèbres thoraciques avec des côtes. Les plus postérieurs de tous se développent en vertèbres caudales. Des différences entre embryons de vertébrés sont notables non seulement en ce qui concerne le nombre global de somites mais aussi à propos du nombre de somites affectés d'une certaine identité. Une dinde, par exemple, a un nombre plus important de vertèbres cervicales que le poulet. Les valeurs de position qui conduisent à l'apparition d'une identité régionale sont spécifiées avant que la formation des somites elle-même ne commence. Ainsi, si le mésoderme somitique non segmenté de la région thoracique présomptive d'un embryon de poulet est greffé à la place du mésoderme présomptif de la région du cou, il se formera des vertèbres thoraciques avec des côtes (Fig. 5.26). Comment le mésoderme pré-somitique est-il ensuite configuré pour que les somites acquièrent leur identité et forment des vertèbres particulières ?

5.10 L'identité des somites le long de l'axe antéro-postérieur est spécifiée par l'expression des gènes Hox

Les variations de l'organisation antéro-postérieure du mésoderme apparaissent clairement à l'observation des vertèbres dont l'anatomie spécifique est liée à leur position le long de l'axe. Les vertèbres les plus antérieures sont spécialisées pour l'attache et l'articulation du crâne cependant que les vertèbres cervicales sont suivies par les vertèbres thoraciques porteuses de côtes, côtes dont les vertèbres de la région lombaire sont dépourvues de même que les vertèbres sacrées et caudales. La mise en place du patron squelettique le long de l'axe corporel est fondée sur l'acquisition par les cellules mésodermiques d'une valeur de position qui reflète leur localisation le long de l'axe et qui détermine ainsi leur développement futur. Les cellules mésodermiques qui formeront les vertèbres thoraciques par exemple, ont des valeurs de position différentes de celles qui conditionneront la formation des vertèbres cervicales. Le concept de valeur de position a d'importantes implications pour le déroulement du développement ; il impose qu'une cellule ou un groupe de cellules chez l'embryon acquiert un état unique en fonction de sa localisation à un moment donné. Cet état est ensuite interprété pour spécifier une identité régionale qui déterminera le développement ultérieur (voir Section 1.15).

L'organisation de l'axe antéro-postérieur implique chez toutes les espèces l'expression de gènes qui spécifie l'identité régionale le long de cet axe. Les gènes homéotiques ont été identifiés initialement chez la drosophile (voir Chapitre 2) où ils spécifient l'identité segmentaire le long de l'axe antéro-postérieur, et plus tard il est apparu que des gènes Hox apparentés étaient impliqués dans le patron de l'organisation antéro-postérieure des vertébrés. Les gènes Hox sont des membres de la grande famille des gènes à homéoboîte qui interviennent dans beaucoup d'aspects du développement (Encart 5E). Comme il sera vu plus loin, chez les embryons de vertébrés, la mise en place du profil des expressions géniques le long de l'axe antéro-postérieur par les gènes Hox et d'autres gènes à homéoboîtes ne se restreint pas aux seules structures mésodermiques. Par exemple, dans le cerveau postérieur, des régions distinctes présentent des profils d'expression particuliers des gènes Hox.

Les gènes Hox constituent l'exemple le plus manifeste de l'existence d'une grande conservation des gènes du développement chez les animaux. Bien qu'ait été largement acceptée l'idée qu'il y a des mécanismes communs à toutes les espèces pour régir le développement, il paraissait au début peu probable que les gènes impliqués pour spécifier l'identité segmentaire chez la drosophile puissent être les mêmes que ceux spécifiant l'identité somitique chez les vertébrés. Cependant, la comparaison des gènes par les homologies de séquences s'est révélée extrêmement fructueuse pour identifier les gènes apparentés des vertébrés. De nombreux autres gènes identifiés en premier lieu chez la drosophile, chez laquelle la base génétique du développement est mieux comprise que chez aucun autre animal, se sont révélés posséder des homologues impliqués dans le développement des vertébrés.

La plupart des vertébrés possède 4 complexes séparés de gènes Hox, les **complexes Hox** Hoxa, Hoxb, Hoxc et Hoxd, qui sont considérés comme issus de duplications des complexes géniques mêmes au cours de l'évolution des vertébrés. Certains gènes Hox de chacun de ces complexes peuvent également résulter d'une duplication (voir Encart 5E). Le poisson-zèbre se singularise en possédant 7 complexes de gènes Hox, suite à davantage de duplications. Un trait particulier concernant l'expression des gènes Hox, à la fois chez les insectes et chez les vertébrés, est que les gènes des complexes s'expriment dans un ordre spatial et temporel qui reflète celui de leur localisation sur le chromosome. Les complexes Hox constituent le seul cas connu où la disposition des gènes sur un chromosome correspond au profil spatial de leur expression chez l'embryon.

Un modèle simple permet d'illustrer comment un complexe de gènes Hox est à même de déterminer l'identité régionale par le jeu d'une combinatoire. Considérons quatre gènes I, II, III, IV disposés dans cet ordre sur un chromosome (Fig. 5.27). Les gènes sont exprimés dans un ordre correspondant le long de l'axe antéro-postérieur corporel. Ainsi le gène I est exprimé sur toute la longueur du corps avec sa limite antérieure d'expression au niveau de l'extrémité céphalique. Le gène II possède sa limite antérieure en arrière de celle du gène précédent, et son expression se poursuit postérieurement. Les mêmes principes s'appliquent aux deux autres gènes. Ce patron d'expression définit quatre régions distinctes, chacune d'elles exprimant une combinaison différente de gènes. Si la quantité d'un produit génique varie dans chaque domaine d'expression, par exemple à la suite d'interactions entre gènes, beaucoup plus de régions peuvent être spécifiées.

Le rôle des gènes Hox dans la mise en place de l'organisation axiale chez les vertébrés a été le mieux étudié chez la souris, en raison du fait qu'il est possible soit d'invalider des gènes Hox particuliers soit d'altérer leur expression chez des souris transgéniques (voir Section 3.10 et Encart 3D). Comme chez tous les vertébrés, les



Fig. 5.27 L'activité génique peut spécifier l'identité régionale. Le schéma montre comment le patron d'expression génique le long de l'axe corporel peut spécifier des régions distinctes W, X, Y et Z. Par exemple, seul le gène I est exprimé dans la région W, alors que quatre gènes sont exprimés dans la région Z.

ENCART 5E Les gènes Hox

Les gènes Hox des vertébrés codent des produits appartenant à un grand ensemble de protéines régulatrices de gènes qui toutes contiennent une région similaire de liaison à l'ADN d'environ 60 acides aminés. Cette région, connue sous le nom d'homéodomaine, contient un motif hélice-tour-hélice de liaison à l'ADN caractéristique de nombreuses protéines se liant à l'ADN. L'homéodomaine est codée par une séquence d'ADN contenant environ 180 paires de bases appelée homéoboîte, nom qui résulte du fait qu'initialement cette famille de gènes fut découverte, chez la drosophile, par le biais de mutations responsables de transformations homéotiques, où une structure est remplacée par une autre. Par exemple, chez un mutant homéotique de la drosophile, un segment corporel qui normalement n'est pas porteur d'ailes est transformé en un segment voisin qui en comporte, ce qui aboutit à une mouche à quatre ailes au lieu des deux normales (voir Fig. 2.50).

Les gènes Hox chez la drosophile sont organisés en deux groupes de gènes distincts ou complexes géniques, les complexes Antennapedia et bithorax (connus collec-

tivement sous le nom de complexe HOM-C). Chez les vertébrés, dont l'espèce humaine, les gènes Hox sont organisés en quatre groupes dits groupes Hox ou **complexes Hox**. Les poissons-zèbres ont sept complexes Hox au lieu de quatre, suite à une duplication partielle de la totalité du génome au cours de leur histoire évolutive. Les homéoboîtes des gènes de chaque complexe sont par leur séquence se liant à l'ADN, proches des gènes du complexe HOM-C de la drosophile. Dans chaque complexe Hox, l'ordre des gènes dans l'ADN de 3' à 5', est celui dans lequel les gènes s'expriment le long de l'axe antéro-postérieur et qui spécifie les identités régionales. Chez la souris, les quatre complexes Hox appelés Hoxa, Hoxb, Hoxc et Hoxd (initialement nommés Hox1, Hox2, Hox3 et Hox4) sont localisés respectivement sur les chromosomes 6, 11, 15 et 2 (voir Fig. 1 ; chez l'espèce humaine, les complexes Hoxa, Hoxb, Hoxc et Hoxd sont localisés sur les chromosomes 7, 17, 12 et 2). Tous les gènes Hox présentent certaines affinités entre eux ; l'homologie la plus marquée est au niveau de l'homéoboîte, et elle l'est moins dans les séguences en dehors de celle-ci. Les guatre complexes sont considérés comme résultant de duplications d'un complexe

génique ancestral. Les gènes qui se correspondent dans les différents complexes (par exemple *Hoxa4*, *Hoxb4*, *Hoxc4 et Hoxd4*) sont dits des gènes paralogues, qui collectivement forment des sous-complexes de gènes paralogues. Chez la souris et l'espèce humaine, il existe 13 sous-complexes de gènes paralogues.

Les gènes Hox et leur rôle dans le développement sont d'origine ancienne. Les gènes de la souris et de la grenouille sont similaires entre eux et de ceux de la drosophile, à la fois pour leurs séquences codantes et leur ordre sur les chromosomes. Chez la drosophile et les vertébrés, ces gènes homéotiques sont impliqués dans la spécification régionale identitaire le long de l'axe antéro-postérieur. Beaucoup d'autres gènes possèdent une homéoboîte mais cependant n'appartiennent pas à un complexe homéotique, ni ne sont responsables de transformations homéotiques. Chez les vertébrés, d'autres sous-familles de gènes à homéoboîte incluent les gènes Pax, qui contiennent une homéoboîte typique du gène *paired* de la drosophile. Tous ces gènes codent des facteurs de transcription possédant des fonctions variées dans le développement et la différenciation cellulaire.



Figure 1

Fig. 5.28 Expression de gènes Hox chez l'embryon de souris après la neurulation.

Les trois figures montrent des vues latérales d'embryons de souris à 9,5 dpc colorés par le produit du gène rapporteur *lacZ* (en bleu) lié aux promoteurs des gènes *Hoxb1*, *Hoxb4* et *Hoxb9*. Ces gènes sont exprimés dans le tube neural et le mésoderme. Les têtes de flèche indiquent la limite antérieure d'expression de chacun de ces gènes dans le tube neural. À noter que les limites antérieures dans le mésoderme sont différentes de celles dans le tube neural. La position des trois gènes dans le complexe Hoxb est indiquée dans l'insert. Barre d'échelle = 0,5 mm.

Photographie aimablement communiquée par A. Gould.



gènes Hox commencent à s'exprimer dans les cellules mésodermiques des embryons précoces de souris au cours de la gastrulation quand ces cellules commencent à s'internaliser au niveau de la ligne primitive vers la région antérieure. Les gènes Hox « antérieurs » s'expriment en premier et les gènes Hox plus « postérieurs » le font lorsque la gastrulation est en cours. Des profils d'expression clairement définis des gènes Hox sont plus facilement observables dans le mésoderme après la somitogenèse et dans le tube neural après la neurulation.

La figure 5.28 montre les profils d'expression de trois gènes Hox chez un embryon de souris au stade E9,5. Classiquement, l'expression de chaque gène est caractérisée par une limite antérieure nette et un étalement postérieur. Bien que les profils d'expression des gènes Hox se chevauchent considérablement spatialement, en particulier ceux des gènes voisins dans un complexe donné, presque chaque région du mésoderme le long de l'axe antéro-postérieur est caractérisée par une combinaison spécifique de l'expression des gènes Hox, comme le montre la figure récapitulant les limites d'expressions antérieures des gènes Hox dans le mésoderme embryonnaire de souris (Fig. 5.29). Par exemple, les somites les plus antérieurs sont caractérisés par l'expression de *Hoxa1* et



Fig. 5.29 Récapitulation de l'expression des gènes Hox le long de l'axe antéropostérieur du mésoderme de souris.

La limite d'expression de chaque gène est montrée par les rectangles rouges. L'expression se prolonge vers l'arrière généralement sur une certaine distance mais la limite postérieure peut être faiblement affirmée. Le patron de l'expression des gènes Hox spécifie l'identité régionale des tissus à différents endroits. Cette figure montre dans sa globalité l'expression des gènes Hox et ne représente pas un instantané de l'expression génique à un moment donné. *Hoxb1* et aucun autre gène Hox n'est exprimé dans cette région, alors qu'au contraire, tous les gènes Hox sont exprimés dans les régions plus postérieures. Les gènes Hox peuvent donc fournir un code pour une identité régionale. L'ordre spatial et temporel de l'expression est similaire dans le mésoderme et le système nerveux dérivé de l'ectoderme, mais les limites entre les zones d'expressions géniques dans les deux feuillets embryonnaires ne correspondent pas toujours (voir Fig. 5.28). Le cerveau postérieur est la région corporelle la plus antérieure où s'expriment les gènes Hox. D'autres gènes à homéoboîte tels que *Emx* et *Otx*, mais pas les gènes Hox, sont exprimés chez les vertébrés dans les régions les plus antérieures du corps c'est-à-dire cerveau moyen et antérieure et la partie antérieure de la tête (voir Chapitre 12).

En ne considérant que le complexe des gènes Hoxa, *Hoxa1* se révèle être le gène qui possède l'expression la plus antérieure dans le mésoderme, le mésoderme postérieur céphalique, alors que *Hoxa11*, un gène très postérieur dans le complexe, a sa limite antérieure d'expression dans la région sacrée (voir Fig. 5.29). Cette correspondance exceptionnelle, ou **colinéarité**, entre l'ordre des gènes sur le chromosome et l'ordre de leur expression spatiale et temporelle le long de l'axe antéro-postérieur est caractéristique de tous les complexes Hox. Les gènes de chaque complexe Hox sont exprimés selon une séquence ordonnée, avec le gène situé le plus en 3' dans le complexe s'exprimant le plus précocement et le plus antérieurement spatialement. L'expression correcte des gènes Hox dépend de leur position dans le complexe, les gènes « antérieurs » en 3' s'exprimant avant ceux plus « postérieurs » en 5'. Cette activation séquentielle typique des gènes Hox selon l'ordre dans lequel ils se trouvent sur le chromosome est vraisemblablement due, au moins en partie, à des modifications de l'état de la chromatine (voir Encart 8A).

L'idée que les gènes Hox sont impliqués dans la spécification de l'identité régionale est soutenue par la comparaison faite de leurs profils d'expression, chez la souris et le poulet, pour des régions bien définies anatomiquement soit cervicale, thoracique, sacrée et lombaire (Fig. 5.30). L'expression des gènes Hox coïncide avec les différentes régions. Par exemple, même si le nombre des vertèbres cervicales chez les oiseaux



Fig. 5.30 Patrons de l'expression des gènes Hox dans le mésoderme d'embryons de poulet et de souris et leur relation avec le phénomène de régionalisation. Le patron de l'expression des gènes Hox varie le long de l'axe antéro-postérieur. Les vertèbres (carrés) de la colonne vertébrale sont issues des somites embryonnaires (cercles), dont 40 sont montrés ici. Les vertèbres présentent des formes caractéristiques dans chacune des cinq régions le long de l'axe antéro-postérieur : cervicale (C), thoracique (T), lombaire (L), sacrée (S) et caudale (Ca). La correspondance entre somites et vertèbres donnés diffère chez le poulet et la souris. Par exemple, les vertèbres thoraciques débutent avec le somite 19 chez le poulet, mais avec le 12 chez la souris. Malgré cette différence, la transition d'une région à une autre correspond à un patron similaire de l'expression des gènes Hox chez le poulet et la souris. Ainsi, chez les deux espèces, les limites antérieures de l'expression de *Hoxc5* et de *Hoxc6* sont situées de part et d'autre de la zone de transition entre les vertèbres cervicales et thoraciques (de bleu pâle à bleu moyen). De manière similaire, les limites antérieures de *Hoxd10* sont localisées de part et d'autre de la transition entre les régions lombaire et sacrée (de vert à bleu foncé) chez le poulet et la souris.

Illustration d'après Burke, A.C., et al. : Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. Development 1995, **121** : 333-346.

(14), est le double de celui des mammifères, les limites antérieures de l'expression des gènes *Hoxc5* et *Hoxc6* dans les somites de poulet et de souris sont situées de part et d'autre de la frontière cervico-thoracique. Une correspondance entre expression des gènes Hox et identité régionale est conservée également chez les vertébrés pour d'autres limites anatomiques.

Il est à souligner que la figure récapitulative de l'expression des gènes Hox donnée Fig. 5.29 ne représente pas un instantané de l'expression à un moment particulier mais plutôt une représentation cumulée de l'ensemble des profils d'expression. Certains gènes ont une expression déclenchée précocement et qui se réduit ensuite, cependant que d'autres ont une expression activée beaucoup plus tardivement, les gènes Hox les plus « postérieurs » notamment, tels que *Hoxd12* et *Hoxd13*, qui sont exprimés dans la queue. De plus, ce schéma récapitulatif reflète seulement l'expression générale des gènes dans n'importe quelle région ; tous les gènes Hox exprimés dans une région ne le sont pas dans toutes les cellules. Néanmoins, l'ensemble des profils suggère que la combinaison des gènes Hox exprimés spécifie l'identité régionale. Dans la région cervicale, par exemple, chaque somite, et donc chaque vertèbre, pourra être spécifié par un patron unique d'expression de gènes Hox ou **code Hox**.

Comme cela est montré Fig. 5.26, des expériences de greffe indiquent que les caractéristiques des somites sont déjà déterminées dans le mésoderme pré-somitique, et que du tissu pré-somitique transplanté à un autre niveau de l'axe corporel conserve son identité d'origine. Comme on pouvait s'y attendre, si le code Hox spécifie une identité vertébrale, le mésoderme pré-somitique transplanté conserve également son patron d'origine pour l'expression des gènes Hox.

5.11 La délétion ou la surexpression de gènes Hox entraîne des modifications dans la mise en place du patron axial

Si les gènes Hox spécifient l'identité régionale qui détermine ensuite le développement de la région concernée, il semble plausible que des modifications morphologiques puissent se produire quand leurs profils d'expression sont altérés. C'est en effet le cas. Pour étudier la fonction des gènes Hox, leur expression peut être abolie par des mutations ou se réaliser dans des sites anormaux. L'expression d'un gène Hox peut être supprimée par *knock-out* chez un embryon de souris en développement (voir Section 3.10 et Encart 3D). Les expériences décrites ici montrent que la manière dont est affecté le patron axial, suite à l'absence de gènes Hox donnés, conforte l'idée que ceux-ci procurent aux cellules leur identité régionale. Dans quelques cas, cependant, l'invalidation individuelle d'un gène produit peu d'effet ou affecte seulement un tissu, et des modifications plus conséquentes dans la mise en place de l'organisation axiale sont uniquement observées quand deux gènes ou plus, en particulier des **gènes paralogues** de complexes Hox différents (voir Encart 5E), sont invalidés ensemble.

Les souris chez lesquelles le gène Hoxd3 a été invalidé montrent des défauts structuraux au niveau des deux premières vertèbres cervicales où ce gène s'exprime normalement de façon forte (voir Fig. 5.29), et à celui du sternum. Cependant, les structures plus postérieures, où le gène inactivé est aussi exprimé normalement avec d'autres gènes Hox, ne montrent pas d'altérations évidentes. Cette observation illustre un principe général de l'expression des gènes Hox, qui est que les gènes Hox exprimés plus postérieurement tendent à abolir la fonction des gènes Hox plus antérieurs toutes les fois qu'ils sont co-exprimés. Ce phénomène est connu sous le nom de dominance postérieure ou prévalence postérieure. Il a été proposé que l'intervention de microARN (miARN) codés par des gènes à l'intérieur des complexes Hox puisse expliquer cette prévalence postérieure. Ces miARN sont vraisemblablement impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des protéines Hox (voir Encart 6C, pour la fonction des miARN). La plupart des gènes destinés à être des cibles pour un miARN donné tendent à être plus localisés du côté 3' du gène du miARN que du côté 5'. Compte tenu de cette disposition, les miARN Hox pourraient aider à réprimer le fonctionnement de gènes Hox plus antérieurs et ainsi expliquer le principe général de la prévalence postérieure.

Un autre point général illustré par l'invalidation de *Hoxd3* est que les effets d'un *knockout* d'un gène Hox peuvent être tissu spécifique, par le fait que seuls certains tissus dans lesquels le gène Hox est exprimé normalement sont affectés, alors que d'autres tissus situés au même niveau le long de l'axe antéro-postérieur apparaissent normaux. Par exemple, bien que *Hoxd3* soit exprimé dans le tube neural, les arcs branchiaux et le mésoderme para-axial situés au même niveau antéro-postérieur du corps, seules les vertèbres sont altérées par son invalidation. L'absence apparente d'un effet dans de tels cas peut être due à une redondance, des gènes paralogues d'un autre complexe étant capables de compenser. *Hoxa3* est fortement exprimé dans les mêmes tissus que *Hoxd3* dans la région cervicale, mais quand *Hoxa3* seul est éteint, aucune altération des vertèbres cervicales n'est observée et d'autres défauts existent, telles des réductions d'éléments cartilagineux dérivant du deuxième arc branchial. Quand *Hoxa3* et *Hoxd3* sont tous les deux invalidés, des défauts plus importants se manifestent à la fois au niveau des vertèbres cervicales et aussi à celui des dérivés de l'arc branchial, ce qui suggère que normalement les deux gènes fonctionnent ensemble dans ces tissus.

La perte de fonction des gènes Hox se traduit souvent par une transformation homéotique, conversion d'une partie du corps en une autre, comme cela peut s'observer de manière spectaculaire chez la drosophile (voir Fig. 2.50). C'était le cas vu précédemment avec l'invalidation du gène *Hoxd3* chez la souris. Une analyse détaillée de la région cervicale de ces souris a révélé que la première vertèbre cervicale, l'atlas, apparaît transformée en un os occipital à la base du crâne, et que l'axis, la seconde vertèbre cervicale, a acquis des traits morphologiques ressemblant à ceux de l'atlas. Ainsi, en l'absence de l'expression de *Hoxd3*, les cellules acquièrent une identité régionale plus antérieure qui donne lieu à un développement de structures plus antérieures. La double extinction de *Hoxa3* et *Hoxd3* entraîne la disparition de l'atlas. Ceci suggère qu'une cible de l'action d'un gène Hox est la prolifération cellulaire nécessaire pour qu'une telle structure soit construite à partir des cellules somitiques. Malheureusement, relativement peu de gènes cibles, dont la transcription est régulée de façon directe par des protéines Hox, ont encore été identifiés.

Un autre exemple de transformation homéotique est observé avec l'invalidation de *Hoxc8* chez la souris. Chez les embryons normaux, *Hoxc8* s'exprime dans la région thoracique et dans des régions plus postérieures à partir de la gastrulation (voir Fig. 5.29). Les souris homozygotes pour une délétion du gène *Hoxc8* meurent quelques jours après la naissance, et présentent des anomalies de structure entre la septième vertèbre thoracique et la première lombaire. Les transformations homéotiques les plus visibles sont l'attache d'une 8^e paire de côtes au sternum et le développement d'une 14^e paire de côtes sur la première vertèbre lombaire (Fig. 5.31). Ainsi, comme pour les invalidations de gènes évoquées précédemment, l'absence d'expression de *Hoxc8* a conduit à ce que certaines cellules qui auraient dû l'exprimer dans les conditions normales, ont acquis une identité régionale plus antérieure et ont évolué en accord avec celle-ci.

Certaines transformations homéotiques ne se produisent seulement que si tous les gènes paralogues sont invalidés ensemble. Chez les souris, la non-expression de tous les gènes paralogues du sous-groupe Hox10 provoque l'absence de vertèbres lombaires et la présence de côtes sur toutes les vertèbres postérieures, et pour tous ceux du sous-groupe Hox11, plusieurs vertèbres sacrées deviennent lombaires. Ces transformations homéotiques ne se produisent pas si seuls quelques membres du sous-groupe paralogue sont mutés, suggérant de nouveau une redondance dans le fonctionnement des gènes Hox.

À la différence des effets produits par l'invalidation des gènes Hox, l'expression ectopique de ces derniers dans des régions antérieures, qui normalement ne les expriment pas, provoque la transformation de structures antérieures en des structures qui habituellement se développent dans des positions plus postérieures. Par exemple, quand *Hoxa7*, dont la limite d'expression antérieure normale est dans la région thoracique (voir Fig. 5.29), est exprimée au niveau de la totalité de l'axe antéro-postérieur, l'os basal occipital du crâne est transformé en une structure pro-atlas, normalement la structure squelettique suivante plus postérieure.

5.12 L'expression des gènes Hox est activée selon une orientation antéropostérieure

Chez tous les vertébrés, les gènes Hox commencent à s'exprimer à un stade précoce de la gastrulation, lorsque les cellules mésodermiques entament des mouvements morphogénétiques. Les gènes exprimés le plus antérieurement, qui correspondent à ceux situés à l'extrémité 3' d'un complexe, s'expriment également en premier. Si, par exemple, un gène *Hoxd* « précoce » est relocalisé à l'extrémité 5' du complexe





une structure plus antérieure.



Fig. 5.32 Subdivision des somites en moitiés antérieure et postérieure. Des boucles rétroactives positives et négatives entre Delta1 et Mesp2 (schéma du bas) sont nécessaires pour subdiviser le somite en une moitié antérieure exprimant *Mesp2* et une postérieure exprimant *Delta1* (schémas du haut), ce qui est montré dans des vues dorsales des régions caudales d'embryons de souris à E9,5. *Mesp2* est initialement exprimé dans une large bande dans le mésoderme pré-somitique et ensuite, lorsque le somite se forme, son expression se confine dans la moitié antérieure de celui-ci. *Hoxd*, son profil d'expression spatial et temporel ressemble alors à celui de son voisin *Hoxd13* (voir Encart 5E). Ceci montre que la structure du complexe Hox est primordiale pour la détermination du profil d'expression des gènes Hox.

À la différence du cas de la drosophile, où l'activation des gènes Hox dépend clairement de facteurs distribués inégalement le long de l'axe antéro-postérieur (voir Chapitre 2), le mécanisme de l'activation des gènes Hox chez les vertébrés est plus complexe et moins bien compris. L'un des moyens par lequel le patron antéro-postérieur de l'expression des gènes Hox pourrait s'établir dans le mésoderme somitique est que l'activation génique soit associée au moment où les cellules débutent les mouvements de la gastrulation. Chez le poulet, l'expression des gènes Hox est activée selon un ordre temporel strict, les gènes en 3' s'exprimant avant ceux en 5', dans les cellules épiblastiques à l'origine de la région latérale des somites, avant qu'elles ne s'internalisent au niveau de la ligne primitive postérieure. Les profils d'expression des gènes Hox sont maintenus quand les cellules se déplacent pour former le mésoderme pré-somitique, et ainsi, la temporalité de l'activation des gènes Hox peut être convertie en une identité régionale ; les cellules exprimant différents gènes Hox apparaissent progressivement le long de l'axe antéro-postérieur en même temps que des structures se mettent en place dans un ordre antéro-postérieur. Cette hypothèse est semblable à celle proposée pour la spécification de la position des bourgeons des membres de vertébrés le long de l'axe corporel antéro-postérieur, pour laquelle l'expression de gènes Hox est aussi impliquée (voir Chapitre 11).

L'acide rétinoïque peut aussi jouer un rôle dans l'activation de l'expression des gènes Hox chez le jeune embryon. Le gène de l'enzyme métabolisant l'acide rétinoïque, Cyp26A1, est exprimé dans la moitié antérieure de l'embryon de souris pendant la gastrulation alors que le gène de l'enzyme de synthèse de l'acide rétinoïque Raldh2 est exprimé dans la moitié postérieure. Ceci conduit à l'établissement d'un gradient croissant d'acide rétinoïque depuis les régions antérieures vers les régions postérieures. Plus tardivement dans le développement, comme cela fut évoqué dans la Section 5.8, le gène de Cyp26A1 est exprimé dans la région postérieure de l'axe corporel en cours d'élongation tandis que les somites se mettent en place, et le gradient d'acide rétinoïque s'étend dans le sens antéro-postérieur.

Chez la souris, il a été observé expérimentalement que l'acide rétinoïque modifiait l'expression des gènes Hox. Plus récemment, l'extinction des gènes codant les récepteurs de l'acide rétinoïque et d'autres protéines de sa voie de signalisation chez des embryons de souris, a entraîné des transformations homéotiques du squelette axial. Les embryons de souris dépourvus du gène *Cyp26a1* ont non seulement un tronc axial tronqué, mais aussi une transformation homéotique postérieure, chaque vertèbre prenant l'identité de sa vertèbre voisine plus postérieure, la dernière vertèbre cervicale devenant par exemple, une vertèbre portant des côtes. Ces transformations ont lieu dans des régions où la signalisation rétinoïque est plus élevée que la normale et où une extension antérieure de l'expression de *Hoxb4* a été également observée. Un rôle pour l'acide rétinoïque dans l'activation des gènes Hox est accrédité par des études effectuées sur le poisson-zèbre. Ce dernier porteur de la mutation *giraffe* affectant le gène *Cyp26*, présente une extension antérieure de l'expression des gènes Hox et des transformations homéotiques.

5.13 Le devenir des cellules des somites est déterminé par des signaux provenant de tissus voisins

Le somite sera considéré ici à l'échelle individuelle afin de comprendre en détail sa construction selon les axes antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral. Les différences existant entre les moitiés antérieures et postérieures des somites sont utilisées ultérieurement par les cellules des crêtes neurales et par les nerfs moteurs pour leur guidage conduisant à l'arrangement segmenté des nerfs spinaux (rachidiens) et des ganglions (voir Chapitre 9). Cette subdivision est aussi importante pour la formation des vertèbres, chaque vertèbre se constituant à partir de la moitié postérieure d'un somite et de la moitié antérieure de celui qui lui succède, processus nommé « re-segmentation ».

L'organisation antéro-postérieure d'un somite est totalement indépendante de celui de l'ensemble du mésoderme pré-somitique lié à l'expression des gènes Hox. Les somites sont subdivisés individuellement en moitiés antérieures et postérieures avec des propriétés différentes, cette subdivision étant liée à l'horloge de segmentation. Chez la souris, le facteur de transcription Mesp2 est exprimé dans une large bande



Fig. 5.33 Répartition des devenirs cellulaires d'un somite d'embryon de poulet. Le quadrant ventral médian (en bleu) est à l'origine des cellules du sclérotome, qui migrent pour former le cartilage des vertèbres. Le reste du somite, le dermomyotome, forme le myotome dont tous les muscles du tronc sont issus, cependant que la région épithéliale du dermomyotome donnera le derme de la peau. Le dermomyotome est également à l'origine des cellules musculaires qui migrent dans les bourgeons des membres.

présente dans le mésoderme pré-somitique, qui sera à l'origine du nouveau somite (S0), et son expression se restreint ensuite uniquement dans la partie antérieure du somite (Fig. 5.32). Mesp2 active une cascade d'expressions géniques conduisant à ce que sa propre expression soit maintenue dans la partie antérieure du somite. Cette restriction de l'expression de Mesp2 est interprétée comme étant une conséquence de la signalisation Delta-Notch, déjà évoquée, et est essentielle pour l'établissement des différences entre les moitiés antérieures et postérieures somitiques.

Les somites sont également structurés selon les axes dorso-ventral et médio-latéral. Les cellules situées dans les parties dorsale et latérale d'un somite nouvellement formé constituent le **dermomyotome**, où s'exprime le gène à homéoboîte *Pax3*, de la famille *paired*. Le dermomyotome donne le **myotome**, à l'origine des cellules musculaires, et forme plus tard le feuillet épithélial dorsal au myotome, à partir duquel se forme le derme. Le dermomyotome contient aussi des cellules qui participent à la vascularisation. Les cellules de la région médiane du myotome forme principalement des muscles axiaux et dorsaux (épaxiaux), tandis que les cellules du myotome latéral migrent pour donner les muscles abdominaux et des membres (hypaxiaux). Toutes les cellules déterminées musculairement expriment des facteurs de transcription spécifiques des muscles de la famille MyoD. La partie ventrale de la zone médiane somitique contient les cellules du **sclérotome** qui expriment le gène *Pax1* et qui migrent ventralement pour entourer la chorde et former des vertèbres et des côtes (Fig. 5.33).

Au moment de la formation des somites, la détermination des cellules qui donneront du cartilage, des muscles ou du derme n'est pas encore faite. Ceci est clairement montré par des expériences où l'orientation dorso-ventrale de somites nouvellement formés est inversée mais où s'observe néanmoins un développement normal. La spécification de la destinée des tissus somitiques nécessite des signaux de la part de tissus adjacents. Chez le poulet, la détermination du myotome se produit durant les heures de formation des somites, alors que le futur sclérotome est déterminé plus tardivement. Le tube neural et la chorde produisent des signaux qui modèlent le somite et sont nécessaires pour son futur développement. Si la chorde et le tube neural sont enlevés, les cellules dans les somites entrent en apopotose ; ni vertèbres ni muscles axiaux se développent, alors que la musculature des membres peut encore se réaliser.

Le rôle de la chorde dans la spécification du devenir des cellules somitiques a été montré par des expériences sur le poulet, chez lequel une chorde surnuméraire est implantée au côté du tube neural, à côté d'un somite. Ceci a un effet spectaculaire sur la différenciation du somite, si l'opération est réalisée sur du mésoderme pré-somitique insegmenté. Quand le somite se développe, il y a une conversion presque totale des cellules en précurseurs du cartilage (Fig. 5.34), suggérant que la chorde est un inducteur de ce dernier. Dans un développement normal, les signaux inducteurs du cartilage



Fig. 5.34 Un signal issu de la chorde induit la formation du sclérotome. Une greffe d'une chorde surnuméraire dans la région dorsale d'un somite d'un embryon de poulet au stade 10 somites, supprime la formation du dermomyotome dans cette région dorsale du somite et induit à sa place la formation d'un sclérotome qui se développe en cartilage. La greffe affecte aussi la forme du tube neural et son patron dorso-ventral.



Fig. 5.35 Le patron d'un somite résulte de signaux sécrétés par les tissus voisins. Le sclérotome est spécifié par une protéine signal diffusible, Sonic hedgehog (Shh) (flèches rouges et orange) produite par la chorde (en rouge) et le plancher du tube neural (en orange). Des signaux provenant du tube neural dorsal et de l'ectoderme tels que Wht (flèches bleues) spécifient le dermomyotome, en même temps que des signaux latéraux comme BMP-4 (flèche verte) issus du mésoderme des lames latérales.

Illustration d'après Johnson, R.L., et al. : ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. Cell 1994, **79** : 1165-1173. viennent de la chorde et de la région ventrale du tube neural. D'autres signaux provenant du tube neural dorsal et de l'ectoderme sus-jacent spécifient la partie médiane du dermomyotome, cependant que des signaux issus du mésoderme des lames latérales sont impliqués dans la spécification du dermomyotome latéral (Fig. 5.35).

Certains de ces signaux ont été identifiés. Chez le poulet, la chorde et le plancher du tube neural expriment Sonic hedgehog (Shh), une protéine de sécrétion qui est une molécule clé pour la signalisation de position à différents moments du développement. Shh a été citée dans le Chapitre 1 comme un signal impliqué dans le développement craniofacial (voir Encart 1F), et sera ré-évoquée dans ce chapitre à propos des structures asymétriques par rapport à la ligne médiane. Cette protéine sera de nouveau retrouvée dans le Chapitre 11 (voir Encart 11D, concernant la voie de signalisation Shh) en relation avec le développement des membres, et dans le Chapitre 12 en ce qui concerne l'organisation dorso-ventrale du tube neural. Pour ce qui est des somites, des niveaux élevés du signal Shh spécifient leur région ventrale et sont nécessaires au développement du sclérotome ; des niveaux bas, associés à des signaux en provenance du tube neural dorsal et de l'ectoderme sus-jacent, spécifient leur région dorsale en dermomyotome (voir Fig. 5.35). Les molécules Wnt fournissent des signaux dorsaux. BMP-4 est un signal issu du mésoderme des lames latérales où il est présent à des concentrations supérieures à celles des somites. Les tendons proviennent de cellules qui ont pour origine le domaine dorso-latéral du sclérotome et expriment spécifiquement le facteur de transcription Scleraxis. Cette région donnant naissance aux tendons est induite à la frontière entre sclérotome et myotome.

La régulation de l'expression des gènes à homéoboîte *Pax* dans le somite par des signaux issus de la chorde et du tube neural est importante pour la détermination des destinées cellulaires. *Pax3* s'exprime initialement dans toutes les cellules qui formeront les somites. Son expression est ensuite modulée par des signaux de BMP-4 et de Wnt et se confine alors aux seuls précurseurs musculaires. Régulée ensuite négativement dans les cellules constituant les muscles dorsaux, elle persiste dans les cellules musculaires migrantes qui coloniseront les membres. Les souris mutantes *Splotch* qui n'ont pas de gène *Pax3* fonctionnel, sont dépourvues de muscles des membres. Chez le poulet, *Pax1* a été impliqué dans la formation de l'omoplate, un élément clé de la ceinture pectorale, dont une partie est constituée à partir des somites. Toutes les cellules de l'omoplate expriment *Pax1*, mais à la différence des cellules vertébrales exprimant Pax1, d'origine sclérotomique, la lame de l'omoplate est formée à partir de cellules du dermomyotome des somites 17 à 24 chez le poulet, tandis que la tête de l'omoplate provient du mésoderme des lames latérales.

RÉSUMÉ

Les somites sont des blocs de tissu mésodermique qui sont formés après la gastrulation. Ils se mettent en place de facon séquentielle par paires, de part et d'autre de la chorde, à partir de la région voisine de celle du cerveau postérieur. Les somites sont à l'origine des vertèbres, des muscles du tronc et des membres, et d'une grande partie du derme de la peau. Le mésoderme pré-somitique s'organise selon l'axe antéro-postérieur corporel durant la gastrulation. Cette organisation se manifeste par l'expression des gènes Hox dans le mésoderme pré-somitique. L'identité régionale des somites est spécifiée par des combinaisons distinctes d'expression de gènes des complexes Hox selon l'axe antéro-postérieur, depuis le cerveau postérieur jusqu'à l'extrémité postérieure de l'embryon. L'ordre dans lequel s'expriment ces gènes le long de l'axe coïncide avec celui dans lequel ils se trouvent sur le chromosome. Une mutation ou une surexpression d'un gène Hox provoque, en général, des altérations localisées dans la partie antérieure des régions où le gène est exprimé, et peut être à l'origine de transformations homéotiques. Les gènes homéotiques peuvent être considérés comme codant une information de position qui spécifie l'identité d'une région et son futur développement. Ils agissent en aval sur des gènes cibles pour lesquels peu de connaissances sont acquises.

La mise en place du patron mésodermique selon l'axe médio-latéral et la formation des somites dans le mésoderme para-axial dépendent de l'inhibition de signaux qui autrement spécifieraient le mésoderme en celui des lames latérales. Les somites sont individuellement façonnés par des signaux issus de la chorde, du tube neural et de l'ectoderme, qui induisent au sein de chaque somite, des régions particulières à l'origine de muscles, de cartilages, ou de derme.

Origine des crêtes neurales et leurs devenirs respectifs

Dans cette partie du chapitre seront considérés l'origine et un exemple de devenir des crêtes neurales, celles-ci constituant une population de cellules spécifiques des vertébrés. Les cellules des crêtes neurales ont pour origine les bords de la plaque neurale qui, au cours de la neurulation, se dressent pour former les bourrelets neuraux et se rejoignent pour constituer la partie dorsale du tube neural. Quittant cette zone, elles migrent pour donner naissance à une grande diversité de tissus et de types cellulaires. La migration des cellules des crêtes neurales est décrite plus en détail dans le Chapitre 9. Celle qui s'effectue depuis le cerveau postérieur vers les arcs branchiaux, à partir desquels quelques structures et tissus de la tête des vertébrés sont dérivés, est abordée brièvement dans ce chapitre en relation avec la mise en place d'un patron antéro-postérieur des crêtes neurales.

5.14 Les cellules des crêtes neurales sont issues des bords de la plaque neurale et après avoir migré sont à l'origine d'une grande variété de types cellulaires

Les crêtes neurales sont induites au niveau des limites latérales de la plaque neurale (Fig. 5.36). Cette induction se réalise au cours de la gastrulation, en même temps que celle de la plaque neurale et les premiers marqueurs des crêtes neurales sont détectés au stade 5-7 somites chez le poulet et au stade de la courbure céphalique chez la souris. Le point de vue courant concernant l'induction des crêtes neurales est que leurs cellules forment une bande dans l'ectoderme le long de chaque bordure latérale de la plaque neurale, à un niveau où la valeur du signal BMP est juste au-dessus de celui qui bloque la formation de la plaque neurale (voir Fig. 4.33). Comme on pourrait s'y attendre compte tenu de leur rôle dans l'induction de la plaque neurale, des signaux Wnt et FGF sont aussi impliqués dans la spécification des crêtes neurales. Leur induction se manifeste par l'expression des gènes des facteurs de transcription Sox9 et Sox10, qui en retour activent le gène snail, un marqueur précoce des crêtes neurales. Ce gène est la version « vertébré » du gène snail de la drosophile (voir Section 2.16). Comme il sera vu dans le Chapitre 9, la protéine Snail est impliquée dans la transition epithélio-mésenchymateuse permettant aux cellules de devenir migrantes. Ce type de transition se produit dans beaucoup de cas au cours du développement animal, et la migration des cellules des crêtes neurales en est juste un exemple. Sox10 qui constitue un marqueur des crêtes neurales continue à s'exprimer dans les cellules en migration (Fig. 5.37).

Une fois que les cellules des crêtes neurales ont quitté le tube neural, elles migrent vers divers sites, où elles se différencient en un nombre surprenant de types cellulaires (Fig. 5.38). Les cellules des crêtes neurales sont par exemple à l'origine des neurones et de la glie du système nerveux autonome, des cellules gliales de Schawnn du système nerveux périphérique, des cellules pigmentaires (mélanocytes) de la peau, et des cellules productrices d'adrénaline des glandes surrénales. De manière étonnante, beaucoup d'os, de cartilages et de tissus conjonctifs de la face, des types tissulaires qui sont plus souvent d'origine mésodermique, ont pour origine les crêtes neurales et le mésenchyme céphalique dérivé de celles-ci est désigné sous le terme d'**ectomésenchyme**.

L'immense potentiel de différenciation des crêtes neurales a été initialement découvert en prélevant les bourrelets neuraux d'embryons d'amphibiens et en observant quelles structures manquaient lors du développement. Plus tard, de nombreuses expériences ont fait suite en transplantant des crêtes neurales de caille dans des embryons de poulet (Fig. 5.39), ce qui permet de suivre le devenir des cellules transplantées dans les embryons de poulet et de voir à quels tissus elles contribuent et en quels types cellulaires elles se différencient. Afin d'établir une carte du devenir des crêtes neurales, des petites régions dorsales du tube neural sont greffées dans des positions



Fig. 5.36 Les cellules des crêtes neurales sont spécifiées au niveau des bords latéraux de la plaque neurale. En haut : les cellules des crêtes neurales (en vert) sont spécifiées sur les bords de la plaque neurale (en bleu) où les niveaux de BMP sont juste assez élevés pour empêcher une spécification en plaque neurale. Au centre : formation des bourrelets ou replis neuraux qui transportent ces cellules au niveau des crêtes dorsales du tube neural à partir desquelles elles vont bientôt émigrer (en bas).



Fig. 5.37 Migration des cellules des crêtes neurales chez le poisson-zèbre.

a, Embryon de poisson-zèbre (stade 25 somites, environ 19 h après fécondation) chez lequel l'expression d'ARN du margueur de la crête neurale crestin (en bleu) dans des cellules des crêtes neurales en migration, est détectée par hybridation in situ sur l'embryon fixé. b, Expression de transcrits du gène des crêtes neurales Sox10 (en bleu) dans des cellules des crêtes neurales détectée par hybridation in situ dans un embryon fixé (24 h après fécondation). c, Embryon transgénique de poisson-zèbre au même stade de développement qui comporte un transgène rapporteur dans lequel une séquence codant la GFP est liée à la région du promoteur de Sox10. La GFP est exprimée alors dans les cellules des crêtes neurales exprimant Sox10. À noter la participation des crêtes neurales au niveau céphalique.

Photographies (a) aimablement communiquée par Roberto Mayor (UCL) ; (b,c) reproduit avec la permission de Robert Kelsh : K. Petratou et R. N. Kelsh, unpub.



Fig. 5.38 Structures dérivées des crêtes neurales. Les cellules des crêtes neurales donnent naissance à une large gamme de types cellulaires incluant les mélanocytes, des cellules cartilagineuses et gliales, différents types de neurones se distinguant par leurs spécialisations fonctionnelles et les neurotransmetteurs qu'ils produisent. Les neurones cholinergiques ont pour neurotransmetteur l'acétylcholine, les neurones adrénergiques utilisent principalement la noradrénaline (norépinéphrine), et les neurones peptidergiques et sérotonergiques produisent, respectivement, des neurotransmetteurs peptidiques et la sérotonine.

équivalentes dans des embryons de poulet au même âge, avant le stade migratoire. Cette carte montre une correspondance générale entre la position des cellules des crêtes le long de l'axe antéro-postérieur et la position des cellules et des tissus qui en dériveront selon cet axe (Fig. 5.40). Par exemple, les cellules des crêtes neurales donnant naissance aux tissus des régions faciale et pharyngienne dérivent des crêtes situées en avant du 5^e somite, cependant que les cellules ganglionnaires du système sympathique autonome proviennent des crêtes en arrière de ce somite.

Dans quelle mesure le devenir des cellules est-il fixé avant qu'elles n'entament leur migration ? Certaines cellules sont incontestablement multipotentes. Des cellules auxquelles est individuellement injecté un marqueur dès qu'elles quittent le tube neural peuvent se révéler être à l'origine d'un certain nombre de types cellulaires différents, neuronal et non neuronal. Il a été montré aussi qu'en modifiant la position des crêtes neurales avant que les cellules ne débutent leur migration, les évolutions possibles de celles-ci sont plus grandes que ce que leurs devenirs normaux suggéraient. Des cellules souches multipotentes ont été isolées à partir de crêtes neurales qui sont à l'origine de neurones, de glie, et de cellules musculaires lisses. Des cellules multipotentes similaires ont même été isolées à partir de nerfs périphériques d'embryons de mammifères plusieurs jours après la migration des cellules des crêtes neurales.

Presque tous les types cellulaires issus des crêtes neurales se différencient en culture, ce qui a permis d'évaluer leur potentiel évolutif. La plupart des clones dérivés de cellules des crêtes neurales isolées lors de leur migration contiennent plus d'un type cellulaire, montrant que la cellule était multipotente au moment où elle fut prélevée. Cependant, durant leur migration, les cellules voient leur potentiel décroître progressivement : la taille des clones dérivés devient plus réduite et moins de types cellulaires sont produits. Ainsi, rapidement après le début de leur migration, les cellules des crêtes neurales forment un mélange de populations cellulaires multipotentes et de cellules au potentiel déjà restreint.

5.15 Les cellules des crêtes neurales migrent à partir du cerveau postérieur pour coloniser les arcs branchiaux.

Les neurones et les cellules des crêtes neurales acquièrent leur identité régionale par les gènes Hox qu'ils expriment en tant que constituants du tube neural, et dans le cas des cellules des crêtes neurales, cette expression est maintenue pendant leur migration. Ceci est illustré ici par les cellules des crêtes neurales présentes au niveau du cerveau postérieur qui migrent pour coloniser les arcs branchiaux où elles contribueront à la formation de tissus mésenchymateux (os, cartilages et tissus conjonctifs) de la face et du crâne. Chez l'embryon de poulet cette migration des cellules de l'ectomésenchyme s'accomplit en une dizaine d'heures, entre les deux premiers jours après la ponte. Les cellules des crêtes neurales crâniennes, qui migrent à partir de la région dorsale du cerveau postérieur, sont agencées de manière métamérisée étroitement corrélée avec celle de cette région cérébrale qui présente des unités appelées rhombomères. La façon avec laquelle cette organisation se met en place dans le cerveau sera abordée dans le Chapitre 12. Les voies de migration ont été suivies *in vivo* chez le poulet par un marquage des cellules des crêtes neurales. Celles des rhombomères 2, 4 et 6 colonisent, respectivement, les premier, second et troisième arcs branchiaux (Fig. 5.41).

Les cellules des crêtes ont déjà acquis leur identité régionale avant de commencer à migrer. Quand les cellules du rhombomère 4 sont remplacées par des cellules issues du rhombomère 2, prélevées chez un autre embryon, ces dernières pénètrent dans le second arc branchial, mais forment des structures caractéristiques du premier arc dans lequel elles auraient du normalement migrer. Ceci peut conduire au développement d'une mâchoire inférieure surnuméraire chez l'embryon de poulet. Cependant les cellules des crêtes neurales possèdent une certaine plasticité et leur différenciation terminale dépend de signaux originaires des tissus où elles ont migré.

L'implication des gènes Hox dans la spécification de l'identité des crêtes neurales de la région du cerveau postérieur a aussi été montrée par des *knock-out* de gènes chez la souris. Les résultats obtenus ne sont pas toujours aisés à interpréter, dans la mesure où l'invalidation d'un gène Hox particulier peut affecter différentes populations de cellules des crêtes neurales chez un même animal, telles que celles qui donneront des neurones et celles qui formeront l'ectomésenchyme. Le *knock-out* du gène *Hoxa2*, par exemple, entraîne des altérations squelettiques dans la région céphalique correspondant au domaine normal d'expression du gène, qui s'étend en arrière du rhombomère 2. Les éléments squelettiques du second arc branchial, qui proviennent tous des cellules des crêtes neurales issues du rhombomère 4, sont anormaux et certains éléments squelettiques normalement présents dans le premier arc branchial se développent dans le second arc.

RÉSUMÉ

Les cellules des crêtes neurales ont pour origine les bordures marginales de la plaque neurale et migrent depuis le tube neural en formation pour se différencier en un large éventail de types cellulaires dans l'ensemble du corps, incluant les systèmes sympathique, parasympathique et nerveux entérique, les mélanocytes de la peau et certains os de la face. Avant qu'elles ne quittent les crêtes, certaines cellules ont encore un large potentiel de développement cependant que d'autres ont déjà une destinée restreinte. Un code génique Hox fournit un code régional pour le tube neural et les cellules des crêtes neurales. Celles qui migrent à partir du cerveau postérieur colonisent les arcs branchiaux selon un mode dépendant de leurs positions.







Fig. 5.39 Tracé des voies de migration cellulaire après une greffe d'une fraction de tube neural de caille dans un poulet hôte. Un fragment de tube neural d'embryon de caille est greffé dans une position similaire chez un poulet hôte. La photographie montre la migration des cellules des crêtes neurales de la caille (flèches rouge). Leur migration peut être suivie grâce à un marqueur nucléaire qu'ont les cellules de caille, ce qui les distingue des cellules du poulet.

Photographie aimablement communiquée par N. Le Douarin. Fig. 5.40 Destinée et évolution possible des cellules des crêtes neurales. La carte du devenir des crêtes neurales (en bas) montre qu'il existe une correspondance générale entre la position des cellules le long de l'axe antéro-postérieur et l'emplacement des structures auxquelles ces cellules donnent naissance (en haut). Par exemple, la partie des crêtes qui sera à l'origine de l'ectomésenchyme céphalique se situe dans la région antérieure. Cependant, les possibilités évolutives des cellules des crêtes neurales, à l'exception de l'ectomésenchyme présomptif, s'avèrent nettement plus grandes que leur destinée dévolue.



Ainsi, l'invalidation de *Hoxa2* produit une transformation homéotique partielle d'un arc branchial en un autre. Ceci montre que les gènes Hox codent une information de position qui spécifie l'identité régionale des cellules des crêtes neurales de la partie métamérisée crânienne de la même façon que les gènes Hox le font dans les somites.

Détermination de l'asymétrie gauche-droite

Pour clore ce chapitre consacré à la façon avec laquelle le plan corporel est spécifié chez les embryons de vertébrés, il sera abordé ici comment se met en place dans le corps une asymétrie corporelle interne entre la gauche et la droite. Pour diverses structures telles que les yeux, les oreilles et les membres, les vertébrés possèdent une symétrie bilatérale par rapport au plan médian du corps. Mais si cette symétrie s'exprime en externe, la plupart des organes internes tels que le cœur ou le foie sont en fait asymétriques en étant, respectivement, à gauche et à droite. Ceci représente une **asymétrie gauche-droite**.

5.16 La symétrie bilatérale des jeunes embryons disparaît avec la mise en place de l'asymétrie gauche-droite des organes internes.

La spécification gauche-droite est fondamentalement différente de celle des autres axes de l'embryon, la gauche et la droite n'ayant un sens seulement qu'après que les axes antéro-postérieur et dorso-ventral ont été mis en place. Si un de ces axes était inversé, il en sera alors de même pour l'axe gauche-droite (c'est la raison pour laquelle la latéralité est inversée quand on se regarde dans une glace : l'axe dorso-ventral étant



Fig. 5.41 Expression des gènes Hox

dans la région branchiale céphalique. L'expression des gènes Hox est montrée dans le cerveau postérieur (rhombomères r1 à r8), les crêtes neurales, les arcs branchiaux (b1 à b4), et la surface ectodermique. Les flèches indiquent la migration des cellules des crêtes neurales au niveau des arcs branchiaux. Il ne se produit pas de migration significative à partir de r3 et de r5.

Illustration d'après Krumlauf, R. : Hox genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. Trends Genet. 1993, **9** : 106-112

= 0,1 mm.

par N. Brown.

Fig. 5.42 L'asymétrie droite-gauche du cœur de souris est sous contrôle génétique. Chaque photographie montre un cœur de souris vu de face après que les torsions ont eu lieu. L'asymétrie normale du cœur résulte de sa torsion vers la droite, comme l'indique la flèche (à gauche). 50 % des souris qui sont homozygotes pour le gène muté *iv* ont des cœurs qui s'enroulent vers la gauche (à droite). Barre d'échelle

Photographies aimablement communiquée



inversé, la gauche devient la droite et vice versa). Il est suggéré pour expliquer la mise en place d'une asymétrie gauche-droite, qu'une asymétrie initiale au niveau moléculaire est convertie en une asymétrie aux niveaux cellulaire et multicellulaire. Si cela s'avère exact, les molécules asymétriques ou la structure moléculaire auraient besoin d'être orientées selon les deux axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

L'asymétrie gauche-droite a lieu précocement lors du développement. Bien que le mécanisme de la disparition de la symétrie initiale soit encore inconnu, la cascade d'événements qui s'ensuit, conduisant à une asymétrie des organes, est mieux comprise. Ces événements provoquent des différences de l'expression génique, entre la gauche et la droite, dans le mésoderme des lames latérales des jeunes embryons autour de la période où se forment les somites, et ces différences sont ensuite traduites en une asymétrie de la localisation et de la forme des organes. Chez la souris et l'espèce humaine, le cœur est par exemple à gauche, le poumon droit a plus de lobes que le gauche, l'estomac et la rate se couchent vers la gauche, et la masse du foie est déportée vers la droite. Cette latéralité des organes est remarquablement constante, mais il existe quelques rares individus, environ un sur 10 000 chez les humains, qui présentent une configuration connue sous le terme de *situs inversus*, correspondant à une image complète en miroir de leur latéralité. Des personnes de ce type sont généralement asymptomatiques, même si tous leurs organes sont inversés. Un cas similaire peut être observé chez les souris porteuses de la mutation *iv*, chez lesquelles une asymétrie des organes est randomisée (Fig. 5.42). Dans ce cas, randomisé signifie que certains mutants iv présenteront une asymétrie normale des organes et certains autres une inversion. Chez d'autres souris porteuses de la mutation *inversion of turning (inv)*, la latéralité est constamment inversée.

La mutation *iv* chez la souris porte sur le gène qui code la dynéine, une protéine qui agit comme un moteur directionnel microtubulaire nécessaire pour le mouvement ciliaire et le transport intracellulaire. Les malades atteints du syndrome de Kartagener caractérisé par un *situs inversus* ont des cils anormaux, ou ceux qui présentent d'autres syndromes liés à un développement ciliaire anormal, appelés ciliopathies, se caractérisent par une altération de l'asymétrie gauche-droite. Ceci suggère que chez la souris et l'espèce humaine, le fonctionnement normal de l'appareil ciliaire est nécessaire à l'asymétrie gauche-droite.

Bien que ne soit pas encore connu si c'est l'activité ciliaire qui initie la rupture de la symétrie gauche-droite, celle-ci est critique pour l'induction de l'expression asymétrique des gènes impliqués dans l'établissement de la gauche *versus* la droite chez les embryons de souris, de poisson-zèbre et de xénope. Dans ces embryons autour du stade de la gastrulation, un flux de liquide extracellulaire dirigé vers la gauche, traversant la ligne médiane embryonnaire, est créé par des populations transitoires de cellules ciliées (Fig. 5.43). Chez la souris, des cellules ciliées, localisées dans une dépression formée sous le nœud, endroit où n'existe pas d'endoderme sous-jacent, provoquent ce flux de liquide. La direction du flux dépend de l'alignement des corpuscules basaux des cils. Il y a deux types de cils sur les cellules recouvrant la dépression : des cils centraux mobiles qui génèrent le flux, et des cils périphériques immobiles. Le

Nodal T Nodal T

Fig. 5.43 Chez l'embryon de souris, le flux de liquide extracellulaire dirigé vers la gauche dû à un battement ciliaire génère une asymétrie gauche-droite par rapport à la ligne médiane. Un flux de liquide se manifeste suite au battement de cils de cellules tapissant une dépression sur la face ventrale du nœud. Il y a deux types de cils : des cils centraux mobiles (en bleu) qui génèrent le flux et des cils immobiles périphériques (en rouge). Le battement rotationnel coordonné des cils centraux génère un flux de liquide extracellulaire dirigé vers la gauche. Une hypothèse est que les cils immobiles sont sensibles à la direction du flux et leur stimulation mécanique provoque la libération de Ca²⁺ intracellulaire dans les cellules à gauche du nœud, comme cela est montré ici. La propagation du signal calcique aux cellules voisines conduit ensuite à une régulation positive de l'expression de Nodal sur le côté gauche (en bas, flèche large).

battement rotationnel coordonné des cils centraux génère un flux de liquide extracellulaire dirigé vers la gauche. Une hypothèse est que les cils immobiles agissent comme des mécano-senseurs vis-à-vis de la direction du flux, leur stimulation provoquant une libération de Ca²⁺ intracellulaire dans les cellules à gauche du nœud. La propagation du signal calcique vers les cellules voisines conduit ensuite l'activation de l'expression de Nodal sur le côté gauche. D'autres hypothèses proposent que le flux dirigé vers la gauche conduit à une accumulation, à la gauche du nœud, d'un morphogène, et que celui-ci causerait, directement ou indirectement, une régulation positive de Nodal.

Chez le poisson-zèbre, l'épithélium ciliaire met en mouvement des vésicules remplies de liquide connues sous le nom de vésicules de Kupffer, qui apparaissent au niveau de la ligne médiane du bourgeon caudal à la fin de la gastrulation, alors que chez le xénope, c'est une région triangulaire de mésoderme cilié formant le toit de l'archentéron qui encadre la ligne médiane de ce dernier. L'asymétrie gauche-droite est éliminée par l'utilisation de morpholinos antisens (voir l'encart 6B) qui, en supprimant l'expression des gènes de la dynéine ciliaire, annule l'activité ciliaire au niveau soit des vésicules de Kupffer du poisson-zèbre soit du toit de l'archentéron de xénope. Si une inversion du flux de liquide se dirigeant vers la gauche est imposée dans le nœud ventral, l'asymétrie gauche-droite s'inverse aussi chez les embryons de souris. Chez les embryons de poulet, cependant, une ciliature mobile ne paraît pas être présente sur la face ventrale du nœud et à la place, un mouvement cellulaire passif vers la gauche semble être impliqué dans l'établissement d'une expression asymétrique des gènes.

Une des protéines clés gauchisante est Nodal dont le gène va s'exprimer à un niveau élevé sur le côté gauche de l'embryon. *Nodal* est initialement exprimé de façon symétrique de chaque côté du nœud chez les embryons de souris et de poulet, et l'est au voisinage des vésicules de Kupffer chez le poisson-zèbre et du toit de l'archentéron chez le xénope. De petites différences initiales dans l'expression de *Nodal* entre les côtés gauche et droit, induites par le flux de liquide orienté vers la gauche et traversant la ligne médiane chez la souris, le poisson-zèbre et le xénope, s'amplifient ensuite en raison de l'existence d'une boucle rétro-positive. Ceci est dû au fait que Nodal, en activant son propre gène, augmente sa production (voir Encart 5A).

L'expression asymétrique de *Nodal* sur le côté gauche est suivie par une extension et une activation stable de cette expression dans le mésoderme des lames latérales gauche, et s'accompagne de celle du gène du facteur de transcription Pitx2, un autre facteur clé gauchisant. Ce patron « gauchisé » de l'expression génique dans le mésoderme des lames latérales, à l'origine d'organes internes tels que le cœur, est hautement conservé, étant trouvé chez la souris, le poisson-zèbre, le xénope et le poulet. Il a été montré dans les embryons de poulet que si l'expression de *Nodal* ou de *Pitx2* se réalise de manière symétrique dans le mésoderme des lames latérales, alors l'asymétrie des organes est randomisée.

5.17 La rupture de la symétrie droite-gauche peut être initiée dans les cellules du jeune embryon

Une indication précoce de l'asymétrie gauche-droite chez les embryons de xénope et de poulet est l'existence d'une activité asymétrique d'une pompe H^+/K^+ -ATPase. Celle-ci peut être détectée dès la troisième division de segmentation, au stade huit cellules, chez le xénope, et un traitement des jeunes embryons avec des drogues inhibant la pompe cause une randomisation de l'asymétrie. La raison de l'apparition de cette asymétrie de la H^+/K^+ -ATPase reste inconnue, mais une possibilité est que les ARNm du transporteur d'ions et/ou de la protéine transporteuse d'ions elle-même puissent être déplacés par des moteurs moléculaires le long d'éléments cytosquelettiques orientés dans l'œuf fécondé. Chez le xénope, la désorganisation de l'actine corticale lors de la première division de segmentation peut affecter l'asymétrie gauche-droite. Cette dernière établie durant les premiers stades de la segmentation pourrait conduire à des alignements asymétriques des corpuscules basaux des cils des cellules du toit de l'archentéron.

Chez le poulet, un mécanisme détaillé pour la mise en place de l'asymétrie gauchedroite fondée sur l'activité asymétrique d'une H⁺/K⁺-ATPase dans le nœud de Hensen a été proposé (Fig. 5.44). Il a été observé que l'activité de la pompe est réduite sur le côté gauche du nœud, entraînant une dépolarisation membranaire et une libération de calcium cellulaire déversé dans l'espace extracellulaire situé du côté gauche.



Cette libération de calcium provoque à son tour une expression des ligands de Notch, Delta-like et Serrate, selon un patron spatial qui pourrait activer la protéine transmembranaire de signalisation Notch seulement sur le côté gauche du nœud (la voie de signalisation Notch est illustrée dans l'Encart 5D).

L'activité Notch, associée à un signal de la protéine de sécrétion Sonic hedgehog (Shh) (voir Encart 11D pour la voie de signalisation Shh), qui est fortement exprimée sur le côté gauche du nœud, provoque sur le côté gauche l'expression de *Nodal* dans le mésoderme des lames latérales. L'expression à gauche de *Shh* peut être due à un déplacement passif vers la gauche de cellules exprimant *Shh* ; l'expression de *Shh* sur le côté droit est réprimée par l'activine, membre de la famille du TGF- β . La signalisation Nodal, induite à gauche par la combinaison des signalisations Notch et Shh, active l'expression du gène du facteur de transcription Pitx2 sur le côté gauche. Si un culot de cellules sécrétant Shh est déposé sur le côté droit, alors l'asymétrie des organes devient randomisée.

La moitié droite de l'embryon est protégée de la signalisation Nodal par la protéine Lefty, qui est sécrétée par la chorde et le plancher du tube neural. Lefty est un antagoniste de la signalisation Nodal se liant à la protéine Nodal, ce qui empêche la fixation de celle-ci sur ses récepteurs et l'activation de ces derniers. Lefty pourrait aussi interagir avec le récepteur même et être ainsi en compétition directe avec Nodal pour la fixation sur le récepteur (voir Encart 5A).

RÉSUMÉ

La mise en place d'une asymétrie cohérente des organes trouvée chez les vertébrés se manifeste par l'expression de la protéine de sécrétion Nodal et le facteur de transcription Pitx2 seulement sur le côté gauche. Cette asymétrie apparaît générée par des mécanismes variés, impliquant une asymétrie d'une pompe à proton-potassium (chez le xénope et le poulet), un mouvement ciliaire dirigé vers la gauche (chez la souris, l'espèce humaine, le poisson-zèbre et le xénope) et une localisation asymétrique de la signalisation calcique, l'activation de la voie Notch, les signalisations Sonic hedgehog et Nodal.

Résumé du Chapitre 5

 Le développement précoce du poulet et de la souris est lié à la manière avec laquelle l'embryon est nourri ; l'œuf de poulet contient une grande quantité de vitellus, tandis qu'un événement précoce du développement de l'embryon de souris est l'apparition de cellules à l'origine du placenta.

Fig. 5.44 Détermination de l'asymétrie gauche-droite chez le poulet. L'activité d'une pompe proton-potassium (H+/K+-ATPase) dans le nœud de Hensen est réduite du côté gauche du nœud, ce qui entraîne une différence de potentiel membranaire dans le nœud et une libération accrue de calcium (Ca²⁺) dans l'espace extracellulaire à la gauche du nœud (à gauche). Ceci conduit à une plus grande activation de la signalisation Notch sur la gauche du nœud, qui en retour active l'expression du gène Nodal dans les cellules à gauche du nœud. Nodal associée à Sonic hedgehog (Shh) provoque l'expression de Nodal dans le mésoderme des lames latérales situé à gauche, ce qui entraîne la production du facteur de transcription Pitx2, un déterminant majeur de la gauche (schéma de droite). L'activité Shh est inhibée par l'activine dans le côté droit. Lefty, antagoniste de Nodal, présent dans la moitié gauche de la chorde et le plancher du tube neural, constitue une barrière médiane qui évite que la signalisation Nodal puisse s'exercer sur le côté droit. Ceci est une version simplifiée d'un ensemble complexe d'interactions.

- Il y a de nombreuses similitudes dans la façon avec laquelle les feuillets embryonnaires sont spécifiés et organisés chez tous les vertébrés malgré les différences topologiques de leurs embryons.
- L'organisateur a des fonctions équivalentes dans les quatre modèles d'embryons de vertébrés. Durant la gastrulation, les feuillets embryonnaires, spécifiés lors des stades plus précoces du développement embryonnaire, deviennent organisés selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral.
- À la fin de la gastrulation, le plan corporel de base a été mis en place et le futur tissu nerveux a été induit à partir de l'ectoderme dorsal.
- Chez le poulet et la souris, la chorde et les somites sont générés à partir de populations cellulaires s'auto-renouvelant autour du nœud pendant l'allongement corporel.
- Les somites forment des blocs successifs de tissu mésodermique de chaque côté de la chorde.
- Des régions spécifiques au sein de chaque somite sont à l'origine de cartilages (précurseurs du squelette), de muscles et du derme, et ces régions sont spécifiées par des signaux en provenance de la chorde, du tube neural, du mésoderme des lames latérales et de l'ectoderme.
- L'identité régionale des cellules le long de l'axe antéro-postérieur est codée par l'expression une combinatoire de gènes des quatre complexes des gènes Hox.
- Il existe une co-linéarité à la fois spatiale et temporelle entre l'ordre des gènes Hox disposés sur le chromosome et l'ordre suivant lequel ils s'expriment le long de l'axe corporel depuis la région du cerveau postérieur jusqu'à l'extrémité postérieure de l'embryon.
- L'inactivation ou la surexpression de gènes Hox peut conduire à des anomalies locales et à des transformations homéotiques d'une région axiale en une autre, indiquant que ces gènes sont primordiaux pour la spécification de l'identité régionale.
- Les crêtes neurales ont pour origine les bords latéraux de la plaque neurale et se retrouvent au niveau dorsal du tube neural, à partir duquel les cellules migrent pour donner naissance à une large gamme de types cellulaires, incluant les cellules du système nerveux périphérique, les cellules pigmentaires et les cellules du tissu conjonctif céphalique.
- L'asymétrie gauche-droite implique une rupture de la symétrie initiale conduisant à une expression génique asymétrique entre les côtés gauche et droit de l'embryon, qui se traduit par une asymétrie dans le positionnement et la morphogenèse des organes.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. 1. Quelles expériences peuvent caractériser l'organisateur chez les embryons de vertébrés ? Dans quelle mesure les organisateurs des différents embryons de vertébrés sont-ils équivalents ? On se référa aux cas du xénope, du poisson- zèbre, du poulet et de la souris.

2. Comment la façon avec laquelle se nourrit l'embryon affectet-elle son développement précoce ? Comparer les quatre modèles de vertébrés et inclure dans la discussion les quantités relatives de réserves vitellines dans les œufs et l'importance des tissus extra-embryonnaires.

3. Faire la distinction entre chorde, moelle épinière et colonne vertébrale et décrire les relations entre les structures suivantes : plaque neurale, bourrelets neuraux, tube neural et crête neurale.

4. La formation des somites chez les embryons de poulet se réalise dans le sens antéro-postérieur en réponse à un gradient de FGF-8. Décrire ce gradient : d'où FGF-8 provient-il ? Pourquoi forme-t-il un gradient ? Comment ce gradient déclenche-t-il la formation somitique ? Quels autres gradients sont présents dans l'embryon à cette période et quelles sont leurs fonctions ?

5. Les complexes de gènes Hox chez la souris (Encart 5E) illustrent plusieurs mécanismes qui opèrent dans l'évolution du génome : les gènes peuvent se dupliquer en donnant naissance à des paralogues, le complexe dans son entier peut être dupliqué et être à l'origine de

complexes paralogues de gènes, et dans n'importe quel complexe donné, des gènes peuvent être perdus. Donner un exemple de chacun de ces mécanismes.

6. Les gènes Hox sont exprimés dans le mésoderme des embryons de vertébrés selon un ordre temporel et spatial, depuis une extrémité à l'autre du complexe de gènes Hox. Se référer à la Fig. 5.29 et comparer l'expression des gènes Hox dans la région cervicale postérieure à celle dans la région antérieure thoracique chez la souris. Comment les profils d'expression génique illustrent-ils le gradient temporel de l'expression le long d'un complexe Hox ? Comment les profils d'expression des expressions peuvent produire des différences dans la combinaison des expressions peuvent produire des différences spatiales de l'identité régionale le long d'un axe ?

7. Comparer les conséquences de la délétion du gène *Hoxc8* chez la souris (Fig. 5.31) avec celle du gène *Ubx* chez la drosophile (Fig. 2.51). Les transformations observées sont-elles des identités antérieures ou postérieures ? Que peuvent dire ces transformations à propos des gènes Hox dans la spécification des identités ? Est-ce que les transformations chez la souris peuvent être qualifiées de transformations homéotiques ?

8. Comment la mutation du *giraffe* (*gir*) du poisson-zèbre conforte-telle l'hypothèse qu'un gradient d'acide rétinoïque peut être impliqué dans la co-linéarité entre l'axe corporel des vertébrés et l'expression des gènes Hox ? Rappeler quels sont les gènes typiquement cités pour le phénotype mutant produit, spéculer sur le phénotype de
la mutation *gir*. Si une délétion (une perte de fonction) du gène *Cyp26a1* chez la souris provoque la transformation des vertèbres cervicales en des vertèbres plus postérieures porteuses de côtes, la mutation *gir* serait-elle de même une perte de fonction, ou, inversement, pourrait-elle être plutôt une mutation qui augmente l'expression du gène (gain de fonction) ? Expliquer.

9. Décrire les effets de l'expérience montrée Fig. 5.34, dans laquelle la chorde venant d'un embryon donneur est greffée au voisinage de la région dorsale du tube neural d'un embryon hôte. Quelle molécule de signalisation peut être invoquée comme responsable de l'induction observée ? De quel type de protéines les protéines Pax relèvent-elles ? Quel est le rôle de Pax3 dans les somites ?

10. À quoi correspond la zone marginale postérieure de l'embryon de poulet ? Quel est son rôle dans le développement du poulet ? Décrire les forces externes qui conduisent à sa formation et les molécules de signalisation qui lui sont associées.

11. L'établissement de l'asymétrie gauche-droite est associé à des taux élevés de la molécule de signalisation Nodal de la famille du TGF- β sur le côté gauche de l'embryon comparativement à son côté droit. Quelles sont les influences qui président à cette asymétrie de concentration de Nodal ? Inclure les rétroactions positives, les signalisations Notch et Sonic hedgehog et la protéine Lefty dans la réponse.

12. De quelle manière les chimères caille-poulet ont-elles été utilisées à propos de l'étude de la crête neurale ? En quoi des expériences menées sur des cellules des crêtes neurales en culture ont-elles augmenté notre connaissance concernant le développement des dérivés des crêtes neurales *in vivo* ?

QCM

- **NB.** Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.
- **1.** Les somites sont à l'origine
- (a) du cœur et du sang
- (b) des organes internes abdominaux
- (c) de la colonne vertébrale et des muscles squelettiques
- (d) de la moelle épinière.

2. La position de l'axe dorso-ventral chez le xénope est déterminée par _____, tandis que celle de l'axe antéro-postérieur chez le poulet est déterminée par_____.

- (a) la gravité ; le point d'entrée du spermatozoïde
- (b) des facteurs maternels dans les deux cas
- (c) la position de l'œuf dans le tractus génital ; la gravité
- (d) le point d'entrée du spermatozoïde ; la gravité.
- 3. Comment produire une souris chimère ?
- (a) Diviser une morula en deux lots de blastomères et laisser chaque lot former un embryon.
- (b) Introduire des cellules issues de la masse cellulaire interne d'un blastocyste dans celle d'un autre blastocyste ayant la même constitution génétique.
- (c) Diviser un œuf fécondé de souris en deux moitiés et laisser chacune d'elles se développer séparément.
- (d) Introduire des cellules issues de la masse cellulaire interne d'un blastocyste dans celle d'un autre blastocyste ayant une constitution génétique différente.

4. Les équivalents de l'organisateur du **xénope** chez le poulet et le poisson-zèbre sont

- (a) le nœud de Hensen et l'écusson embryonnaire
- (b) l'hypoblaste et la couche syncytiale vitelline
- (c) la chorde dans les deux cas
- (d) la ligne primitive et l'endomésoderme.
- **5.** La formation des somites chez les poulets s'effectue
- (a) de la région antérieure vers la région postérieure pendant que le nœud de Hensen recule
- (b) de la région postérieure vers la région antérieure, pendant que s'allonge la ligne primitive
- (c) de la ligne médiane dorsale vers les lames latérales
- (d) globalement en un seul événement le long de l'axe corporel.

6. Le sclérotome d'un somite est à l'origine _____, cependant que le myotome donne naissance aux_____.

- (a) des muscles ; vertèbres.
- (b) du système nerveux périphérique ; muscles.
- (c) la moelle épinière ; muscles des membres.
- (d) des vertèbres, muscles du dos.

7. Les gènes Hox qui sont exprimés le plus antérieurement comportent les gènes Hox

- (a) avec n'importe quels nombres et lettres, dans la mesure où il n'existe pas de relation systématique entre la nomenclature des gènes Hox et leurs profils d'expression
- (b) avec des nombres élevés, comme Hoxa13
- (c) avec des lettres, avec pour des gènes antérieurs Hoxa1-13, et postérieurs Hoxp1-13
- (d) avec des nombres bas, tel que Hoxa1.

8. Les cellules des crêtes neurales contribuent à quels tissus ou structures ?

- (a) les mélanocytes de la peau
- (b) le mésoderme de la face et du crâne
- (c) le système nerveux périphérique
- (d) l'ensemble des tissus et structures ci-dessus.
- 9. Lefty
- (a) agit intracellulairement pour phosphoryler Smads
- (b) agit en tant qu'antagoniste extracellulaire de la signalisation Nodal
- (c) est un facteur de transcription qui régule l'expression du gène *Nodal*
- (d) est un récepteur membranaire de Nodal.

10. Oct4

- (a) est exprimé dans le trophectoderme du blastocyste de souris
- (b) est exprimé dans la masse cellulaire interne du blastocyste de souris
- (c) est une molécule de signalisation qui induit une pluripotence
- (d) est un gène spécifique de souris.

Réponses aux QCM

1 : c, 2 : d, 3 : d, 4 : a, 5 : a, 6 : d, 7 : d, 8 : d, 9 : b, 10 : b.

Références bibliographiques

5.1 La polarité antéro-postérieure du blastoderme de poulet est associée à la ligne primitive

Bertocchini, F., Skromne, I., Wolpert, L., Stern, C.D. :

Determination of embryonic polarity in a regulative system : evidence for endogenous inhibitors acting sequentially during primitive streak formation in the chick embryo. *Development* 2004, **131** : 3381–3390.

Khaner, O., Eyal-Giladi, H. : **The chick's marginal zone and primitive streak formation. I. Coordinative effect of induction and inhibition**. *Dev. Biol.* 1989, **134** : 206–214.

Kochav, S., Eyal-Giladi, H. : Bilateral symmetry in chick embryo determination by gravity. *Science* 1971, 171 : 1027–1029.

Seleiro, E.A.P., Connolly, D.J., Cooke, J. : Early developmental expression and experimental axis determination by the chicken Vg-1 gene. *Curr. Biol.* 1996, **11** : 1476–1486.

Sheng, G. : Day-1 chick development. Dev. Dyn. 2014, 243 : 357–367.

Stern, C.D. : Cleavage and gastrulation in avian embryos (version 3.0). Encyclopedia of Life Sciences 2009 http://www. els.net.

5.2 La séparation des lignées cellulaires de l'embryon et des structures extra-embryonnaires s'effectue lors des stades précoces du développement chez la souris

Arnold, S.J., Robertson, E.J. : Making a commitment : cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nature Mol. Cell Biol. Rev.* 2009, **10** : 91–103.

Clavería, C., Giovinazzo, G., Sierra, R., Torres, M. : **Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo**. *Nature* 2013, **500** : 39–44.

Deb, K., Sivaguru, M., Yul Yong, H., Roberts, M. : Cdx2 gene expression and trophectoderm lineage specification in mouse embryos. *Science* 2006, 311 : 992–996.

Hillman, N., Sherman, M.I., Graham, C. : The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. J. Embryol. Exp. Morph. 1972, 28 : 263–278.

Manzanares, M., Rodriguez, T.A. : Hippo signaling turns the embryo inside out. *Curr. Biol.* 2013, 23 : R559–R561.

Rossant, J., Tam, P.P.L. : Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 2009, **136** : 701–713.

Stephenson, R.O., Rossant, J., Tam, P.P. : Intercellular interactions, position and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, 4 : a008235.

5.3 Le mouvement de l'endoderme viscéral antérieur indique l'axe antéro-postérieur définitif de l'embryon de souris

Bischoff, M., Parfitt, D.E., Zernicka-Goetz, M. : Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst : relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. Development 2008, 135 : 953–962.

Rodriguez, T.A., Srinivas, S., Clements, M.P., Smith, J.C., Beddington, R.S. : Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm. *Development* 2005, **132** : 2513–2520.

Srinivas, S., Rodriguez, T., Clements, M., Smith, J.C., Beddington, R.S.P. : Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm. *Development* 2004, 131 : 1157–1164.

Takaoka, K., Yamamoto, M., Hamada, H. : Origin and role of distal visceral endoderm. *Nature Cell Biol.* 2011, **13** : 743–752.

5.4 Les cartes des territoires présomptifs des embryons de vertébrés se présentent comme des variations d'un même plan de base

Beddington, R.S., Robertson, E.J. : Anterior patterning in mouse. *Trends Genet*. 1998, **14** : 277–284.

5.5 L'induction mésodermique et la mise en place du plan d'organisation chez le poulet et la souris s'effectuent pendant la formation de la ligne primitive

Chapman, S.C., Matsumoto, K., Cai, Q., Schoenwolf, G.C. : **Specification of germ layer identity in the chick gastrula**. *BMC Dev. Biol.* 2007, **7** : 91–107.

Shen, M.M. : Nodal signaling–developmental roles and regulation. *Development* 2007, **134** : 1023–1034.

5.6 Le nœud qui se développe à l'extrémité de la ligne primitive chez le poulet et la souris est équivalent à l'organisateur de Spemann chez le *xénope*.

Beddington, R.S. : Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* 1994, **120** : 613–620.

Joubin, K., Stern, C.D. : Molecular interactions continuously define the organizer during the cell movements of gastrulation. *Cell* 1999, 98 : 559–571.

Kinder, S.J., Tsang, T.E., Wakamiya, M., Sasaki, H., Behringer, R.R., Nagy, A., Tam, P.P. : The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development* 2001, 128 : 3623–3634.

Stern, C.D. : Neural induction : old problem, new findings, yet more questions. *Development* 2005, **132** : 2007–2021.

5.7 L'induction neurale chez le poulet et la souris est initiée par un signal FGF suivie d'une inhibition du signal BMP dans un second temps

Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J.A., Anderson, R.M., May, S.R., MacMahon, J.A., McMahon, A.P., Harland, R.M., Rossant, J., De Robertis, E.M. : The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 2000, 403 : 658–661.

Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsuku, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.-P., Niehrs, C., Izpisúa Belmonte, J.-C., Westphal, H. : Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Cell* 2001, 1 : 423–434.

Ozair, M.Z., Kintner, C., Brivanlou, A.H. : Neural induction and patterning in vertebrates. *WIREs Dev. Biol.* 2013, **2**: 479–498.

Sheng, G., dos Reis, M., Stern, C.D. : **Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation**. *Cell* 2003, **115** : 603–613.

Stern, C. : Neural induction : old problems, new findings, yet more questions. *Development* 2005, **132** : 2007–2021.

Storey, K., Crossley, J.M., De Robertis, E.M., Norris, W.E., Stern, C.D. : Neural induction and regionalization in the chick embryo. *Development* 1992, 114 : 729–741.

Streit, A., Berliner, A.J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., Stern, C.D. : Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 2000, 406 : 74–78.

ENCART 5B Complexes de remodelage chromatidien

Ho, L., Crabtree, G.R. : Chromatin remodelling during development. *Nature* 2010, 463 : 474–484.

5.8 Les structures axiales de poulet et de souris sont générées à partir d'un auto-renouvellement de populations cellulaires

Delfino-Machin, M., Lunn, J.S., Breitkreuz, D.N., Akai, J., Storey, K.G. : Specification and maintenance of the spinal cord stem zone. *Development* 2005, 132 : 4273–4283.

Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., Storey, K. : **Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension**. *Neuron* 2003, **40** : 65–79.

Dubrulle, J., Pourquié, O. : *fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 2004, **427**: 419–422.

Neijts, R., Simmini, S., Giuliani, F., van Rooijen, C., Deschamps, J. : Region-specific regulation of posterior axial elongation during vertebrate embryogenesis. *Dev. Dyn.* 2014, 243 : 88–98.

Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J., Hamada, H. : **The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anteroposterior axis within the mouse embryo.** *Genes Dev.* 2006, **15** : 213–225.

Wilson, V., Olivera-Martinez, I., Storey, K.G. : **Stem cells, signals and vertebrate body axis extension**. *Development* 2009, **136** : 1591–1604.

ENCART 5C L'acide rétinoïque : une petite molécule signal intercellulaire

Niederreither, K., Dolle, P. : **Retinoic acid in development :** towards an integrated view. *Nat. Rev. Genet.* 2008, **9 :** 541–553.

Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M., Giguère, V. : Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 1991, **5** : 1333–1344.

ENCART 5D La voie de signalisation Notch

Bray, S.J. : Notch signalling : a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, **7** : 678–689.

Hori, Y., Sen, A., Artavanis-Tsakonas, S. : Notch signaling at a glance. J. Cell Sci. 2013, 126 : 2135–2140.

Lai, E. : Notch signaling : control of cell communication and cell fate. *Development* 2004, **131** : 965–973.

5.9 Les somites sont formés selon un ordre bien défini le long de l'axe antéro-postérieur

Dequeant, M.L., Pourquié, O. : Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat. Rev. Genet.* 2008, 9 : 370–382.

Gomez, C., Pourquié, O. : Developmental control of segment numbers in vertebrates. J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 2009, 312 : 533–544.

Kieny, M., Mauger, A., Sengel, P. : Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of the axial skeleton of the chick embryo. *Dev. Biol.* 1972, 28 : 142–161.

Kulesa, P.M., Schnell, S., Rudloff, S., Baker, R.E., Maini, P.K. : From segment to somite : segmentation to epithelialization analyzed within quantitative frameworks. *Dev Dyn.* 2007, 236 : 1392–402.

Lewis, J. : Autoinhibition with transcriptional delay : a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator. *Curr. Biol.* 2003, **13** : 1398–408.

- Maroto, M., Bone, R.A., Dale, J.K. : **Somitogenesis**. *Development* 2012, **139** : 2453–2456.
- Oates, A.C., Morelli, L.G., Ares, S. : Patterning embryos with oscillations : structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development* 2012, 139 : 625–639.
- Stern, C.D., Charité, J., Deschamps, J., Duboule, D., Durston, A.J., Kmita, M., Nicolas, J.-F., Palmeirim, I., Smith, J.C., Wolpert, L. : Head-tail patterning of the vertebrate embryo : one, two or many unsolved problems ? *Int. J. Dev Biol.* 2006, 50 : 3–15.

5.10 L'identité des somites le long de l'axe antéro-postérieur est spécifiée par l'expression des gènes Hox

Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., Tabin, C. : Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 1995, **121**: 333–346.

Nowicki, J.L., Burke, A.C. : Hox genes and morphological identity : axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *Development* 2000, **127** : 4265–4275.

Wellik, D.M. : Hox genes and vertebrate axial pattern. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2009, **88** : 257–278.

ENCART 5E Les gènes Hox

Pearson, J.C., Lemons, D., McGinnis, W. : Modulating Hox gene functions during animal body patterning. Nat. Rev. Genet. 2005, 6: 893–904.

5.11 La délétion ou la surexpression de gènes Hox entraîne des modifications dans la mise en place du patron axial

Condie, B.G., Capecchi, M.R. : Mice with targeted disruptions in the paralogous genes Hoxa3 and Hoxd3 reveal synergistic interactions. *Nature* 1994, **370** : 304–307.

Favier, B., Le Meur, M., Chambon, P., Dollé, P. : Axial skeleton homeosis and forelimb malformations in Hoxd11 mutant mice. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1995, 92 : 310–314.

Kessel, M., Gruss, P. : Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of the codes induced by retinoic acid. *Cell* 1991, 67 : 89–104.

Mallo, M., Wellik, D.M., Deschamps, J. : Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev. Biol.* 2010, 344 : 7–15.

Wellik, D.M., Capecchi, M.R. : Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 2003, **301** : 363–367.

Yekta, S., Tabin, C., Bartel, D.P. : MicroRNAs in the Hox network : an apparent link to posterior prevalence. *Nat. Rev. Genet.* 2008, 9 : 789–796.

5.12 L'expression des gènes Hox est activée selon une orientation antéro-postérieure

Abu-Abed, S., Dollé, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon,
P., Petkovich, M. : The retinoic acid-metabolizing enzyme
CYP26A1 is essential for normal hindbrain patterning,
vertebral identity and development of posterior structures. *Genes Dev.* 2001, 15 : 226–240.

Wellik, D.M. : Hox patterning of the vertebrate axial skeleton. *Dev. Dyn.* 2007, **236 :** 2454–2463.

Emoto Y., Wada, H., Okamoto, H., Kudo, A., Imai, Y. : **Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish**. *Dev. Biol.* 2005, **278 :** 415–427.

5.13 Le devenir des cellules des somites est déterminé par des signaux provenant de tissus voisins

Brand-Saberi, B., Christ, B. : Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr. Topics Dev. Biol.* 2000, 48 : 1–42.

Brent, A.E., Braun, T., Tabin, C.J. : Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. *Development* 2005, 132 : 515–528.

Olivera-Martinez, I., Coltey, M., Dhouailly, D., Pourquié, O. : Mediolateral somitic origin of ribs and dermis determined by quail-chick chimeras. Development 2000, 127 : 4611–4617.

Pourquié, O., Fan, C.-M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Bréant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M., Le Douarin, N.M. : Lateral and axial signals involved in avian somite patterning : a role for BMP-4. *Cell* 1996, 84 : 461–471.

Shearman, R.M., Tulenko, F.J., Burke, A.C. : **3D reconstructions** of quail-chick chimeras provide a new fate map of the avian scapula. *Dev. Biol.* 2011, **355 :** 1–11.

Tonegawa, A., Takahashi, Y. : Somitogenesis controlled by Noggin. *Dev. Biol.* 1998, 202 : 172–182.

5.14 Les cellules des crêtes neurales sont issues des bords de la plaque neurale, et après avoir migré, sont à l'origine d'une grande variété de types cellulaires

Huang, X., Saint-Jeannet, J-P. : Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev. Biol* 2004, **275** : 1–11.

Kelsh, R.N., Erickson, C.A. : **Neural crest : origin, migration and differentiation**. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2013, http://www. els.net/

Le Douarin, N., Kalcheim, C. : *The Neural Crest*. 2nd edn. Cambridge : Cambridge University Press, 1999.

5.15 Les cellules des crêtes neurales migrent à partir du cerveau postérieur pour coloniser les arcs branchiaux.

Grammatopoulos, G.A., Bell, E., Toole, L., Lumsden, A., Tucker, A.S. : Homeotic transformation of branchial arch identity after Hoxa2 overexpression. *Development* 2000, **127** : 5355–5365.

Krumlauf, R. : Hox genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. *Trends Genet*. 1993, **9**: 106–112.

Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G., Dupin, E. : Neural crest plasticity and its limits. *Development* 2004, 131 : 4637–4650.

Rijli, F.M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dolle, P., Chambon, P. : **A homeotic transformation is generated in the** rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa2*, which acts as a selector gene. *Cell* 1993, **75** : 1333–1349.

5.16 La symétrie bilatérale des jeunes embryons disparaît avec la mise en place de l'asymétrie gauche-droite des organes internes.

Brennan, J., Norris, D.P., Robertson, E.J. : Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes Dev.* 2002, 16 : 2339–2344.

Brown, N.A., Wolpert, L. : **The development of handedness in left/right asymmetry**. *Development* 1990, **109 :** 1–9.

McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., Brueckner, M. : **Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse**. *Cell* 2003, **114** : 61–73.

Rana, A.A., Barbera, J.P., Rodriguez, T.A., Lynch, D., Hirst, E., Smith, J.C., Beddington, R.S.P. : Targeted deletion of the novel cytoplasmic dynein mD2LIC disrupts the embryonic organiser, formation of body axes and specification of ventral cell fates. *Development* 2004, 131 : 4999–5007.

Raya, A., Izpisua Belmonte, J.C. : Unveiling the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo. *Mech. Dev.* 2004, 121 : 1043–1054.

Schlueter, J., Brand, T. : Left-right axis development : examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos. *Cytogenet. Genome Res.* 2007, 117 : 256–267.

Shen, M.M. : Nodal signaling : developmental roles and regulation. *Development* 2007, **134** : 1023–1034.

5.17 La rupture de la symétrie droite-gauche peut être initiée dans les cellules du jeune embryon

Blum, M., Beyer, T., Weber, T., Vivk, P., Andre, P., Bitzer, E., Schweickert, A. : *Xenopus*, an ideal model system to study vertebrate left-right asymmetry. *Dev. Dyn.* 2009, 238 : 1215–1225

Gros, J., Feistel. K., Viebahn, C., Blum, M., Tabin, C.J. : **Cell** movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick. *Science* 2009, **324** : 941–944.

Raya, A., Izpisua Belmonte, J.C. : Insights into the establishment of left-right asymmetries in vertebrates. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008, **84** : 81–94.

Vandenberg, L.N., Levin, M. : A unified model for left-right asymmetry ? Comparison and synthesis of molecular models of embryonic laterality. *Dev Biol.* 2013, 379 : 1–15.

Yoshiba, S., Hamada, H. : **Roles of cilia, fluid flow, and Ca**²⁺ **signaling in breaking of left-right symmetry**. *Trends Genet*. 2014, **30 :** 10–17.

Développement des nématodes et des oursins

Nématodes

• Échinodermes

Après avoir considéré le développement embryonnaire précoce de la drosophile et des vertébrés, certains autres aspects de ce même thème sont abordés ici en prenant deux autres modèles de non-vertébrés où s'expriment quelques mécanismes différents. Le nématode Caenorhabditis elegans est un modèle très important tant pour la spécification des destinées cellulaires en relation directe avec des divisions asymétriques, que pour son développement précoce dont le patron s'établit selon une stratégie cellule par cellule plutôt que par des morphogènes affectant des ensembles cellulaires. Les oursins, représentatifs des échinodermes, constituent des modèles de développement avec un fort pouvoir de régulation, et leur développement illustre, sous la forme d'un système plus simple, certains principes communs avec le développement des vertébrés qui est aussi à fort pouvoir de régulation. Le cas d'un troisième groupe de non-vertébrés, les ascidies, a fait l'objet d'une attention consultable en ligne.

Dans ce chapitre sont considérés des aspects de la mise en place du plan corporel chez deux modèles de non-vertébrés, les nématodes et les oursins, ceux-ci représentant les échinodermes. La position phylogénétique des organismes discutés dans ce chapitre est montrée dans la Fig. 1.11. Ils se conforment à un même plan général de développement : une segmentation aboutissant à une blastula (ou un stade équivalent chez *Caenorhabditis*), à laquelle fait suite la gastrulation où se manifeste l'émergence du plan corporel.

Il existe une vieille distinction, un peu en retrait actuellement, faite entre développement mosaïque ou à régulation, la différence étant que dans le développement à régulation, les décisions concernant le devenir des cellules s'effectuent par des interactions entre ensembles cellulaires, alors que dans le développement mosaïque, les décisions sont prises de manière autonome par les cellules elles-mêmes (voir Section 1.12). Les nématodes montrent beaucoup d'exemples de développement de type mosaïque tandis que les embryons d'oursins ont un fort pouvoir de régulation. Cependant chez la plupart des embryons s'observe la présence de ces deux types de développement.

À la différence de ce qui s'observe chez la drosophile, les vertébrés et les oursins où la spécification du devenir cellulaire concerne des ensembles cellulaires, celle-ci s'effectue souvent chez les nématodes cellule par cellule, ce qui est typique d'un développement mosaïque, et ne repose pas sur une information de position établie par des gradients de morphogènes. Les jeunes embryons de beaucoup de non-vertébrés contiennent très peu de cellules, et chaque cellule acquiert une identité unique à un stade précoce du développement. Chez le nématode, par exemple, il n'y a que 28



Informations supplémentaires concernant les Ascidies

cellules quand la gastrulation débute, comparé aux milliers de cellules de l'embryon de drosophile au même stade.

La spécification cellules par cellules se réalise souvent par le biais d'une **division cellulaire asymétrique** et d'une distribution inégale de déterminants cytoplasmiques (voir Section 1.17), et les cellules filles qui en sont issues présentent de manière autonome des destinées différentes. Cependant, ce type de division à des stades précoces du développement ne signifie pas que des interactions cellules-cellules sont absentes ou peu importantes chez ces organismes.

Le nématode *Caenorhabditis elegans* qui a été l'objet de nombreuses études et chez lequel beaucoup de gènes clés du développement et de voies de signalisation ont été identifiés, sera dans un premier temps étudié. Lui succédera le cas des oursins dont le développement se rapproche plus de celui des vertébrés, et chez lesquels les embryons, à fort pouvoir de régulation, sont soumis à des interactions cellulaires hautement régulées, la mise en place de leur plan d'organisation impliquant des ensembles cellulaires.

Nématodes

C. elegans qui est une espèce libre de nématodes vivant dans les sols et dont le cycle vital est montré dans la Fig. 6.1, est devenu un organisme modèle important en biologie du développement. Ses avantages sont sa convenance pour des analyses génétiques, ses cellules peu nombreuses et à lignage invariant, et la transparence de ses embryons permettant de suivre la formation de chaque cellule. Ceci a conduit Sydney Brenner à choisir cette espèce comme modèle pour étudier les bases génétiques du développement. Le prix Nobel de Physiologie ou de Médecine en 2002 a été attribué à Brenner et à ses collaborateurs, Robert Horvitz et John Sulston, pour leurs découvertes concernant le contrôle génétique du développement des organes et de l'apoptose, à partir de leurs études sur ce ver.





Fig.6.1 Cycle vital du nématode

Caenorhabditis elegans. Après clivage et embryogenèse, il existe quatre stages larvaires (L1-L4) avant qu'un adulte sexuellement mature ne se développe. Les individus adultes sont généralement hermaphrodites, quoiqu'existent aussi des individus mâles. Les photographies montrent : stade deux cellules (en haut, barre d'échelle = 10 μ m); un embryon après la gastrulation avec une future larve recroquevillée (au milieu, barre d'échelle = 10 μ m); et les quatre stades larvaires et l'adulte (en bas, barre d'échelle = 5 μ m).

Photographies aimablement communiquées par J. Ahringer.



C. elegans a une anatomie simple et les adultes ont environ 1 mm de long et seulement 70 µm de diamètre. Les nématodes peuvent être cultivés en grand nombre sur des plaques d'agar et les larves à des stades précoces peuvent être conservées congelées et revenir à la vie ensuite. Les adultes sont principalement **hermaphrodites**, les individus produisant des spermatozoïdes pendant un temps court puis se mettant à produire des ovocytes. Ils sont capables d'autofécondation. Des mâles en petit nombre existent et peuvent être utilisés pour des accouplements. Le développement embryonnaire est rapide, l'éclosion d'une larve se faisant au bout de 15 h à 20 °C, avec toutefois des stades larvaires s'étendant sur près de 50 h jusqu'au stade adulte.

L'œuf de nématode est petit, ovoïde et de seulement 50 µm de long. Les globules polaires sont expulsés au moment de la fécondation. Avant que les noyaux mâle et femelle ne fusionnent, il se produit un pseudo-clivage, et ce n'est qu'après leur fusion que la véritable segmentation débute (Fig. 6.2). La première division est asymétrique et génère une cellule antérieure AB et une cellule postérieure plus petite P_1 . Lors de la deuxième division, AB produit antérieurement ABa et postérieurement ABp, tandis que P_1 se divise en P_2 et EMS. À ce stade, les axes principaux peuvent déjà être identifiés avec P, en position postérieure et ABp en position dorsale.

Les cellules issues de AB et de P_2 se divisent également selon un patron bien défini qui donneront les autres tissus du ver. La gastrulation débute au stade 28 cellules, quand les cellules dérivées de la cellule E issue de la division de EMS et qui formeront le tube digestif, pénètrent à l'intérieur de l'embryon. Les cellules qui apparaissent au cours du développement embryonnaire ne survivent pas toutes, une **mort cellulaire programmée**, ou **apoptose**, de cellules particulières faisant partie intégrante du développement du nématode (Encart 6A).

La larve nouvellement éclose (Fig. 6.3), qui présente une organisation similaire à celle de l'adulte mature, est sexuellement immature et est dépourvue de gonades et de ses structures associées nécessaires pour la reproduction, telle que la vulve chez

Fig. 6.2 Segmentation de l'embryon de Caenorhabditis elegans. Après la fécondation, les pronucléi du spermatozoïde et de l'ovule fusionnent. Le zygote se divise ensuite en une grande cellule antérieure AB et une plus petite cellule postérieure P₁. À la division suivante, AB se divise en ABa et ABp, cependant que P_1 se divise en P_2 et EMS. Chacune de ces cellules continue à se diviser selon un patron précis donnant des groupes cellulaires à l'origine de types particuliers de cellules et de tissus. La gastrulation débute au stade 28 cellules. À ce stade, une division nouvelle de EMS a produit les cellules E, Ea et Ep, qui donneront l'endoderme du tube digestif, et les cellules MS (non indiquées ici) qui seront à l'origine d'une variété d'autres types cellulaires.

Photographies aimablement communiquées par J. Ahringer.

Fig. 6.3 Larve de Caenorhabditis elegans au stade L1 (20 h après la fécondation). La vulve se développera à partie de l'ébauche gonadique.



ENCART 6A Les voies apoptotiques chez les nématodes, la drosophile et les mammifères

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, joue un rôle essentiel dans le développement animal. Chez le nématode, avec son lignage cellulaire invariant, des lignées particulières de cellules, ou certaines cellules d'une lignée donnée sont destinées à disparaître par mort cel-Iulaire programmée (voir Fig. 6.10), et c'est ce qui a permis l'identification du processus et l'analyse de son contrôle génétique. Une apoptose se produit également chez les vertébrés, lors du développement des membres, où elle permet la séparation des doigts (voir Chapitre 11), et dans le développement du système nerveux, durant lequel un grand nombre de neurones meurent pendant la formation des circuits nerveux (voir Chapitre 12). L'apoptose joue aussi un rôle important dans l'homéostasie des tissus adultes, et a un rôle clé en contrôlant la croissance et en prévenant la survenue de cancers (voir Chapitre 13). Elle est également déclenchée par des stimuli spécifiques, qui peuvent être des signaux extracellulaires ou des



Figure 1

facteurs endogènes produits suite à des stress ou à l'absence de signaux de survie de la part des cellules voisines.

Durant l'apoptose, des endonucléases découpent la chromatine en petits fragments. Le cytoplasme se contracte et se fragmente, mais les contenus cellulaires restent entourés par la membrane plasmique, évitant ainsi que les cellules voisines soient endommagées par la libération de molécules potentiellement toxiques normalement séquestrées dans des organites. Des modifications affectant la membrane plasmique facilitent la destruction de la cellule par des cellules phagocytaires telles que les macrophages. Ces caractéristiques distinguent l'apoptose de la mort cellulaire par **nécrose**, où la cellule mourante éclate, répandant son contenu au détriment des cellules voisines.

La voie de mort cellulaire chez le nématode est centrée sur l'activité de CED-3, une protéase appelée **caspase**. Son activation déclenche des changements dans la cellule qui conduisent à sa mort. La voie d'activation de la caspase chez le nématode, ainsi que ses équivalents chez la drosophile et les mammifères, sont montrés dans la Figure 1 (les protéines homologues sont indiquées selon un code couleur). Chez les nématodes homozygotes pour des mutations de perte de fonction soit du gène codant CED-3, soit de celui codant la protéine CED-4 qui active CED-3, aucune des 131 cellules qui meurent normalement ne le fait, mais à la place, elles se différencient de la même façon que leurs cellules sœurs. De façon surprenante, de tels vers survivent correctement et meurent à l'âge habituel au bout de plusieurs semaines.

Le programme de mort programmée du nématode est contrôlé par la protéine CED-9, qui agit comme un frein en se liant constitutivement à CED-4 et en l'empêchant d'activer CED-3. L'apoptose se manifeste quand la protéine EGL-1 est produite en réponse à des signaux pro-apoptotiques et libère CED-4 de son interaction avec CED-9. Si le gène *ced-9* est inactivé par mutation, beaucoup de cellules qui normalement ne meurent pas le font, entraînant la mort de l'embryon. Chez la drosophile (voir Figure 1 au milieu), la fonction de CED-9 du nématode est remplie par un inhibiteur de l'apoptose, la protéine IAP qui inhibe l'action de la caspase. L'inhibition par IAP est abolie par Reaper et d'autres protéines.

Chez les mammifères, l'apoptose est inhibée par Bcl-2 et d'autres protéines apparentées. Certains stimuli apoptotiques entraînent la libération de cytochrome c des mitochondries, ce qui déclenche l'activation de la voie des caspases (voir Figure 1, à droite). Le stimulus apoptotique induit aussi la production d'homologues de EGL-1, Bim et Bid, qui inhibent l'action de Bcl-2, permettant ainsi que se réalise l'apoptose. Comme chez la drosophile, les caspases apoptotiques peuvent être inhibées par IAP. Cette inhibition est abolie par la protéine pro-apoptotique DIABLO, qui est également libérée depuis les mitochondries. La caspase-9 des mammifères engendre une cascade protéolytique aboutissant à la mort de la cellule.

Chez les mammifères et la drosophile (non montré), il y a aussi une contribution d'une voie apoptotique extracellulaire. Des ligands pro-apoptotiques tels que le TNF (pour *Tumor Necrosis Factor*) et le ligand de Fas en interagissant avec des « récepteurs de mort », respectivement, le TNFR et Fas, activent la caspase-8 et la caspase-3. les hermaphrodites. Le développement post-embryonnaire se déroule à travers quatre stades larvaires séparés par des mues. Des cellules additionnelles chez l'adulte sont largement dérivées de cellules précurseurs indifférenciées (cellules P) qui sont réparties le long de l'axe corporel. Chacune de ces cellules blastiques possède un lignage invariant impliquant entre une à huit divisions cellulaires. La vulve par exemple, est dérivée des cellules blastiques P5, P6 et P7. Le développement post-embryonnaire du nématode pourrait être considéré comme l'ajout de structures adultes au plan de base larvaire.

6.1 Le lignage cellulaire de *Caenorhabditis elegans* est en grande partie invariant.

Grâce à la microscopie interférentielle de Normaski, il a été possible d'observer directement le lignage individuel complet de chaque cellule de *C. elegans* (voir bibliographie). Le déroulé des divisions cellulaires est en grande partie invariant, et pratiquement le même pour chaque embryon. La larve à l'éclosion est constituée de 558 cellules, et, après quatre mues, ce nombre atteint 959, sans compter les cellules germinales dont le nombre est variable. Ceci ne représente pas le nombre total de cellules issues d'un œuf dans la mesure où 131 cellules disparaissent par apoptose au cours du développement, principalement lors de la formation du système nerveux. Comme le devenir de chaque cellule à chaque stade est connu, une carte des territoires présomptifs peut être établie précisément à chacun des stades et avec une précision inégalée chez aucun vertébrés. Cependant, même si le lignage cellulaire est invariant, cette précision n'implique pas que le lignage doive déterminer les destinées des cellules ou que celles-ci ne puissent pas être altérées. Des interactions entre cellules ont en effet un rôle majeur dans la détermination des destinées cellulaires chez le nématode.

Le génome de *C. elegans* a été complètement séquencé et il contient près de 20 000 gènes. *C. elegans* ne présente pas d'importants épissages alternatifs et la plupart des gènes code une seule protéine, ce qui explique en partie que malgré sa simplicité anatomique, le ver a besoin apparemment de plus de gènes que la drosophile. Près de 1 700 gènes sont impliqués dans le développement, les deux tiers d'entre eux ayant été trouvés en utilisant la méthode de l'interférence à ARN (ARNi ; Encart 6B). Beaucoup des gènes du développement du nématode sont apparentés à des gènes qui contrôlent le développement chez la drosophile et chez d'autres espèces. Ils incluent les gènes Hox (voir Encart 5E) et les gènes codant des protéines de signalisation des familles TGF- β , Wnt et Notch (voir Encart 4A) et leurs voies intracellulaires associées. Une exception est la voie de signalisation Hedgehog (voir Encart 2F), qui n'est pas présente chez *Caenorhabditis*, quoiqu'il existe des gènes qui peuvent être considérés comme apparentés à *Hedgehog*. Bien que l'expression du génome zygotique débute au stade quatre cellules, des constituants maternels contrôlent presque tout le développement jusqu'à la gastrulation au stade 28 cellules.

6.2 L'axe antéro-postérieur de *Caenorhabditis elegans* est déterminé par des divisions asymétriques

Le développement de *C. elegans* repose sur une invariance, un patron déterminé de divisions cellulaires auquel sont liées les destinées cellulaires. Le premier clivage de l'œuf du nématode est inégal, avec une cellule volumineuse AB antérieure et une plus petite postérieure P_1 . Cette asymétrie définit l'axe antéro-postérieur et est établie lors de la fécondation.

La cellule P_1 se comporte plutôt comme une cellule souche ; à chaque division suivante sont produites une cellule de type P et une cellule fille en position antérieure qui se dirigera dans une voie de développement différente. Lors des trois premières divisions, les cellules filles antérieures de P sont à l'origine de cellules fondatrices, précurseurs de cellules somatiques, mais après la quatrième division, les cellules P ne donneront que des cellules germinales (Fig. 6.4).

La division de la cellule AB donne naissance à des cellules filles AB, antérieure et postérieure. La cellule antérieure ABa est à l'origine de tissus typiquement ectodermiques tel que l'épiderme (appelé hypoderme chez les nématodes) et le système nerveux, mais aussi d'une petite partie du mésoderme pharyngien. La cellule fille postérieure ABp produit également des neurones et de l'hypoderme de même que Fig. 6.4 Lignage cellulaire et destinée cellulaire chez l'embryon précoce de Caenorhabditis elegans. Le patron des clivages est invariant. À la suite de la première division de segmentation du zygote, sont formés une grande cellule antérieure AB et une cellule plus petite postérieure P₁, et les descendants de ces cellules ont des lignées et des destinées constantes. AB se divise en ABa qui produit des neurones, de l'hypoderme et des muscles pharyngiens, et en ABp, à l'origine de neurones, d'hypoderme et de certaines cellules spécialisées. P1 se divise pour donner EMS et P₂. La cellule EMS en se divisant donne les cellules E et MS. Cette dernière donne des muscles, des glandes et des cœlomocytes (cellules sphériques, libres et flottantes), alors que E est l'origine de l'endoderme du tube digestif. Les divisions ultérieures de la lignée P sont plutôt du type cellule souche, avec une cellule fille à chaque division (C et D) donnant une variété de tissus cependant que l'autre $(P_2 \text{ et } P_3)$ continue à se comporter comme une cellule souche. Au final, P₄ est à l'origine des cellules germinales.





certaines cellules spécialisées. Au deuxième clivage, P_1 se divise asymétriquement en donnant P_2 et EMS, cette dernière se divisant ensuite en MS et E. MS est à l'origine de beaucoup des muscles corporels et de la moitié postérieure du pharynx, cependant que E est le précurseur des 20 cellules à l'origine de l'endoderme de l'intestin moyen. La cellule C issue de P_2 lors du troisième clivage forme de l'hypoderme et la musculature pariétale corporelle ; D produite par la cellule P au cours du quatrième clivage ne produit que du muscle. Toutes ces cellules entreprennent ensuite des divisions invariantes, et 100 minutes environ après la fécondation débute la gastrulation.

Avant la fécondation, il n'y a aucune trace d'une asymétrie dans l'ovule, mais la pénétration du spermatozoïde instaure une polarité antéro-postérieure dans l'œuf fécondé qui détermine la localisation de la première division de segmentation et le futur axe embryonnaire antéro-postérieur. Cette division est à la fois inégale et asymétrique. L'existence d'une polarité dans l'œuf fécondé apparaît de manière évidente avant le premier clivage. Une coiffe de microfilaments d'actine se forme à la future extrémité antérieure et des granules cytoplasmiques, appelés granules P, qui contiennent des ARNm maternels et des protéines nécessaires au développement des cellules germinales, se localisent à la future extrémité postérieure. Les granules P ne déterminent pas la polarisation et leur redistribution ne fait que refléter cette dernière. Les granules P restent dans les cellules filles P lors des divisions et finalement se retrouvent concentrés dans la cellule P_4 à l'origine de la lignée germinale (Fig. 6.5).

Fig. 6.5 Localisation des granules P après fécondation. Les mouvements des granules P sont montrés au cours du développement de l'œuf fécondé de *Caenorhabditis elegans* depuis l'entrée du spermatozoïde jusqu'au stade 26 cellules. L'embryon est coloré, à gauche, pour l'ADN afin de visualiser les chromosomes, et à droite, pour les granules P. (a) œuf fécondé avec le noyau de l'ovule à l'extrémité antérieure et celui du spermatozoïde à l'extrémité postérieure. À ce stade, les granules P sont distribués de façon homogène. (b) Fusion des pronucléi. Les granules P se sont déjà déplacés vers l'extrémité postérieure. (c) Stade 2 cellules. Les granules P sont concentrés dans la cellule postérieure. (d) Stade 26 cellules. Tous les granules P sont dans la cellule P₄ qui sera la seule à l'origine de la lignée germinale.

Photographie reproduite avec l'autorisation de Strome, S., Wood, W.B. : **Generation of** asymmetry and segregation of germ-line granules in early C. elegans embryos. Cell 1983, **35** : 15-25. © 1983 Cell Press.



ENCART 6B Extinction génique par des ARN anti-sens et interférence à ARN

Figure 1

Les *knock-out* de gènes suppriment la fonction d'un gène de manière permanente en modifiant sa séquence nucléotidique. D'autres méthodes ayant la même finalité reposent sur la dégradation des ARNm ou l'inhibition de leur traduction. Le gène lui-même étant dans ce cas laissé intact, l'inactivation de la fonction du gène est en principe réversible et est appelée **extinction génique** (pour *knock-out* ou *gene silencing*). Toutes les méthodes d'extinction génique reposent sur l'introduction, dans les embryons ou des cellules en culture, d'un ARN ayant une séquence complémentaire de celle de l'ARNm choisi pour cible. Selon la technique choisie, l'ARN introduit soit se lie à l'ARNm et l'empêche d'être traduit, soit cible une nucléase pour qu'elle se fixe à l'ARNm et le dégrade.

La première technique de ce type à avoir été développée utilise de courts **ARN antisens** synthétiques, qui sont généralement modifiés chimiquement (par exemple, les oligonucléotides morpholinos) afin d'augmenter leur stabilité dans la cellule. Des morpholinos ont été beaucoup employés pour inhiber la fonction de gènes, en particulier chez l'oursin, le xénope et le poisson zèbre.

Une autre méthode est celle de la technique de l'interférence à ARN (ARNi) qui recrute un mécanisme naturel de dégradation des ARN, apparemment ubiquitaire dans l'ensemble des eucaryotes pluricellulaires. Le phénomène a été découvert chez les plantes lors d'expériences de transgenèse, quand il a été observé que l'introduction d'un gène très similaire à l'un des propres gènes de la plante bloquait à la fois l'expression du gène introduit et celle du gène endogène. Il est apparu que le blocage se situait au niveau des ARNm qui semblaient être rapidement dégradés. L'interférence à ARN est maintenant connue comme étant causée par la dégradation d'ARN double brin par une enzyme cellulaire appelée Dicer qui les coupent en petits fragments d'environ 21-23 nucléotides. Ces fragments, appelés **petits ARN interférents** ou **siRNA** (pour small interfering RNA), sont transformés en ARN simple brin et incorporés dans un complexe protéigue nommé RISC (pour RNA-Induced Silencing Complex) comportant une nucléase. Celle-ci est une ribonucléase appelée Argonaute (ou parfois encore Slicer chez les mammifères), qui se lie à l'ARN. Le siRNA est un guide pour RISC lui permettant d'avoir pour cible n'importe quel ARNm ayant une séquence qui lui est complémentaire. L'ARNm est ensuite dégradé par la nucléase de RISC (voir Figure 1). L'interférence à ARN est particulièrement efficace et facile à réaliser chez C. elegans. L'injection d'un ARN double brin chez les adultes conduit à l'extinction du gène correspondant dans leurs embryons. Les vers peuvent également être trempés dans une solution d'ARN qui convient ou nourris avec des bactéries exprimant l'ARN double brin reguis. Le rôle naturel de la machinerie cellulaire d'interférence à ARN servirait à la défense contre les transposons et les virus, beaucoup de ceux-ci produisant des ARN double brin lors de leur multiplication.

Chez les plantes, les champignons, les nématodes, la drosophile et la plupart des cellules à l'exception de celles des mammifères, l'interférence à ARN est réalisée en introduisant un ARN double brin approprié, qui est ensuite transformé en siRNA au niveau cellulaire. Dans les cellules de mammifères, l'introduction d'ARN double brin déclenche une autre réponse de défense qui modifie les effets de l'interférence à ARN qui est dès lors réalisée en introduisant directement les siRNA eux-mêmes, ou en les faisant produire par des constructions artificielles d'ADN.

La polarisation initiale de l'œuf fécondé semble être due au centrosome accompagnant le noyau du spermatozoïde dans l'ovule. Le centrosome, ou centre cellulaire, est une microstructure constituée de microtubules qui organise le cytosquelette microtubulaire de la cellule. Il se duplique pour former les centrosomes présents à chacun des pôles du fuseau de microtubules qui régit la distribution des chromosomes lors de la mitose et de la méiose (le cycle cellulaire mitotique est traité dans l'Encart 1B, et le rôle du centrosome dans la détermination du plan de division est évoqué dans le Chapitre 9. Les microtubules, l'actine et d'autres constituants du cytosquelette sont décrits



Film montrant la polarité précoce de l'embryon de *C. elegans*

Fig. 6.6 Le mouvement du fuseau dans le zygote du nématode provoque une première division inégale. Avant la première division de segmentation, le pôle postérieur du fuseau mitotique se déplace vers l'extrémité postérieure de la cellule, formant un fuseau asymétrique dont la zone médiane est décentrée. La division au niveau de la zone médiane du fuseau conduit à des cellules filles (AB et P₁) de taille inégale.

D'après The Cell Cycle, Morgan, D.O; 2007 et information de Nance & Zallen. Elaborating polarity : PAR proteins and cytoskeleton. Development 2011, **138** : 799-809.



dans l'Encart 9B). Le cortex de la cellule-œuf, couche cytoplasmique située immédiatement sous la membrane plasmique, contient un réseau dense de microfilaments d'actine auquel est associée la myosine, moteur moléculaire formant des assemblages macromoléculaires contractiles d'actinomyosine. L'interaction du centrosome avec le réseau d'actine provoque une contraction asymétrique de ce réseau à partir du point d'entrée du spermatozoïde environ 30 minutes après la fécondation. Ceci conduit à un déplacement généralisé des constituants corticaux vers la future région antérieure du zygote, et un flux cytoplasmique vers la future extrémité postérieure. Parmi les protéines corticales qui sont relocalisées par ce mouvement se trouvent un ensemble de protéines maternelles appelées **protéines PAR** (pour *partitioning proteins*). Celles-ci sont initialement distribuées uniformément, mais deviennent concentrées dans le cortex antérieur ou postérieur après le mouvement cortical et vont contrôler les divisions asymétriques dans le jeune embryon.

Les protéines PAR ont été découvertes de manière fort ingénieuse. Il était imaginé que les mutations affectant l'asymétrie du premier clivage devaient être très rares, et qu'il faudrait observer un nombre important d'embryons pour les mettre en évidence. La démarche adoptée a consisté à utiliser un mutant *egl* chez lequel les œufs fécondés ne sont pas libérés et l'éclosion des larves s'effectue à l'intérieur du parent, le dévorant par l'intérieur et le tuant. Les mutations qui stoppent précocement le développement épargnent le parent, et c'est ainsi que les gènes *par* ont été découverts.

Les embryons dépourvus de protéines PAR fonctionnelles présentent des défauts dans les divisions asymétriques du zygote et de cellules filles. Si le patron normal de division n'est pas maintenu précisément, le développement futur est affecté. Les gènes *par* codent plusieurs types différents de protéines, incluant des protéines kinases et d'autres protéines impliquées dans des voies de signalisation intracellulaire. Des protéines PAR similaires à celles de *C. elegans* sont impliquées dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire dans beaucoup de situations différentes, et sont présentes des nématodes aux mammifères. Chez *C. elegans*, la localisation correcte des protéines PAR est nécessaire pour le positionnement correct et l'orientation des fuseaux mitotiques lors des premiers clivages afin d'assurer la division à la bonne place au sein de la cellule et selon le plan adéquat.

Le flux cortical résultant de l'entrée du spermatozoïde et de la contraction du réseau d'actinomyosine conduit à une localisation antérieure de PAR-3 et de PAR-6, et postérieure de PAR-1 et PAR-2. Cette distribution asymétrique fait qu'ensuite, par des mécanismes qui ne sont pas encore complètement compris, le premier fuseau mitotique est déporté vers la région postérieure par rapport au centre de la cellule, et ainsi le premier clivage est inégal, en produisant des cellules de tailles différentes, et fonction-nellement asymétrique, en formant des cellules contenant des déterminants différents (Fig. 6.6). Les protéines PAR sont impliquées dans la régulation de forces qui tirent de chaque pôle du fuseau pour positionner celui-ci dans la cellule. Les mécanismes qui contrôlent les deux premières divisions de segmentation sont extrêmement complexes dans la mesure où un criblage à grande échelle par ARNi dans lequel près de 98 % des gènes du nématode ont été inactivés individuellement, a montré que plus de 600 gènes interviennent dans ces deux stades.

6.3 L'axe dorso-ventral est déterminé chez *Caenorhabditis elegans* par des interactions intercellulaires

Malgré le lignage cellulaire fortement déterminé chez le nématode, des interactions entre les cellules sont impliquées dans beaucoup de cas de spécification des destinées cellulaire. La détermination de l'axe dorso-dorsal en est un exemple. Au moment du second clivage, si la future cellule antérieure ABa est poussée et retournée à l'aide d'une aiguille de verre, non seulement l'ordre antéro-postérieur des cellules filles de AB est inversé, mais la division de P₁ est aussi affectée, la position relative de la cellule fille de P₁, EMS, par rapport aux cellules AB se trouvant inversée (Fig. 6.7). L'embryon manipulé se développe complètement normalement mais à l'envers, avec son axe dorso-ventral inversé à l'intérieur de la coque de l'œuf. Concernant les cellules-filles de AB, ABp se comporte en cellule antérieure et ABa en cellule postérieure, et la polarité de P₂ est également inversée comparée à celle retrouvée chez un embryon non manipulé. Ceci montre que la polarité dorso-ventrale de l'embryon



Fig. 6.7 Inversion de la polarité dorsoventrale du nématode au stade 4 cellules. Chez les embryons normaux, la cellule AB pivote lors de son clivage entraînant ABa en position antérieure. Si la cellule AB est mécaniquement orientée dans la direction opposée au second clivage, la cellule ABp est alors en position antérieure. Cette manipulation déplace aussi la cellule P, qui fait que lorsqu'elle se divise, la position de la cellule fille EMS est inversée par rapport aux cellules AB. Le développement est encore normal, mais l'axe dorso-ventral est inversé (le ver se développe à l'envers dans la coque de l'œuf). a et p indique l'orientation antérieure/postérieure de la cellule AB avant et après manipulation.

Illustration d'après Sulston, J.E., et al : **The** embryonic cell lineage of the nematode C. elegans. Dev. Biol. 1983, **100** : 69-119.

n'est pas déjà fixée à ce stade et que la destinée des cellules peut être modifiée : ceci implique que leur devenir est spécifié par des interactions entre les cellules. Le développement normal observé à la suite de cette manipulation signifie que l'axe gauche-droite, défini en fonction des axes antéro-postérieur et dorso-ventral, n'est pas encore déterminé, car il peut être inversé par des manipulations réalisées à un stade légèrement plus tardif (*cf. infra*).

Les vers adultes ont une asymétrie gauche-droite bien définie pour leurs structures internes et le patron du développement sur la gauche ou sur la droite de l'embryon est étonnamment différent, plus que chez beaucoup d'autres espèces. Non seulement les lignages cellulaires diffèrent à droite et à gauche, mais certaines cellules se déplacent d'un côté à un autre au cours du développement. Le concept de gauche et droite n'a de sens qu'une fois les axes antéro-postérieur et dorso-ventral établis (voir Section 5.16). Chez *C. elegans*, la spécification gauche-droite se produit normalement lors du troisième clivage, et la latéralité peut être inversée expérimentalement à ce stade. Au troisième clivage, ABa et ABp se divisent chacune en produisant des cellules filles se disposant latéralement à gauche et à droite (par exemple ABa produit ABal et ABar, avec l et r pour *left* et *right*, respectivement). Le plan de segmentation est, cependant, un peu asymétrique par le fait que la cellule fille gauche repose juste un peu en avant



Fig. 6.8 Inversion de la latéralité chez Caenorhabditis elegans. Au stade six cellules d'un embryon normal, la cellule AB sur le côté gauche (ABal) est légèrement antérieure par rapport à celle située à droite (ABar) (en haut à gauche, barre d'échelle = 10 µm). Une manipulation faisant que ABar soit mise en une position plus antérieure conduit à un animal ayant une latéralité inversée (en bas à gauche, barre d'échelle

= 10 μm). Les adultes formés normaux et inversés sont représentés à droite ; barre d'échelle = 50 μm.

Photographies reproduites avec l'autorisation de Wood W.B. : **Evidence** from reversal of handedness in C. elegans embryos for early cell interactions determining cell fates. Nature **1991**, **349** : 536-538. © 1991 Macmillan Magazines Ltd.

de sa cellule sœur de droite. Si les cellules sont manipulées avec une tige de verre pendant le clivage, leur position peut être inversée, la cellule de droite adoptant une position légèrement antérieure (Fig. 6.8). Cette petite manipulation est suffisante pour inverser la latéralité de l'individu.

Alors que les mécanismes moléculaires spécifiant la latéralité ne sont pas connus, la mutation à effet maternel du gène *gpa-16* provoque une orientation du fuseau proche du hasard. En utilisant des allèles mutants de *gpa-16* thermosensibles, et en élevant les embryons à une température pour laquelle les deux premiers clivages sont souvent normaux, il a été possible d'identifier le troisième clivage comme étant celui où la latéralité est déterminée. Chez les vers mutants qui survivaient jusqu'à leur maturité, la latéralité était inversée de droite à gauche dans environ 50 % des cas, et ceci pouvait être imputé à une déviation de l'axe du fuseau mitotique de 90° lors du troisième clivage alors que les embryons qui mouraient présentaient une désorientation complète des axes des fuseaux. La protéine GPA-16 est une sous-unité α de protéine G qui avec d'autres protéines, est impliquée dans le positionnement des centrosomes, et donc du fuseau mitotique.

Il existe des manières de générer une asymétrie fonctionnelle autres qu'une division inégale : par exemple à un stade plus tardif du développement du nématode, une différence fonctionnelle est générée entre deux récepteurs du goût, l'un à gauche et l'autre à droite, de sorte que chacun exprime des gènes codant des chimiorécepteurs différents. Cette expression génique asymétrique est contrôlée par un microARN, produit à partir du *Isy-6*.

6.4 Des divisions asymétriques et des interactions entre les cellules spécifient les destinées cellulaires dans les embryons précoces de nématode

Bien que le lignage cellulaire chez les nématodes soit invariant, des preuves expérimentales telles que celles décrites ci-dessus, montrent que des interactions intercellulaires sont importantes dans la spécification du devenir cellulaire à des stades très précoces du développement. Par ailleurs, l'inversion de ABa et ABp par micromanipulation juste au moment de leur formation (voir Fig. 6.7) ne permet pas la formation d'un ver normal. Cette expérience indique que ABa et ABp doivent être au départ équivalents, mais que leur devenir doit être spécifié par des interactions avec des cellules voisines. Une preuve de ce type d'interaction est donnée en prélevant la cellule P_1 au premier clivage : le résultat est que les cellules pharyngiennes normalement produites par la cellule ABa n'existent plus. Ces expériences et observations montrent également que le lignage cellulaire positionne à la bonne place les cellules qui doivent interagir les unes avec les autres. Ceci explique l'importance apparemment paradoxale des interactions entre les cellules chez un organisme, comme *C. elegans*, dont le développement est dirigé par les lignages cellulaires.

Quelles sont les interactions qui établissent la non-équivalence des deux descendantes de AB ? Si ABp est empêchée d'entrer en contact avec P_2 , elle se développe en une cellule ABa. Ainsi, le blastomère P_2 est responsable de la spécification de ABp. L'induction de l'identité de ABp par P_2 implique les protéines GLP-1 dans la cellule ABp et APX-1 dans P_2 . Ces protéines membranaires sont les homologues chez le nématode respectivement du récepteur Notch et de son ligand Delta (voir Encart 5D). Comme il a été vu précédemment, les interactions entre Notch et ses différents ligands décident du devenir cellulaire dans beaucoup de cas durant le développement dans l'ensemble du règne animal.

GLP-1 est l'une des protéines les plus précocement localisées spatialement lors de l'embryogenèse. L'ARNm *glp-1* maternel est distribué uniformément dans l'embryon, mais sa traduction est réprimée dans les cellules de la lignée P, au stade deux cellules, confinant ainsi la protéine GPL-1 dans la seule cellule AB. Cette stratégie rappelle fortement la localisation de la protéine maternelle Hunchback chez la drosophile (voir section 2.9) et comme pour elle, chez *C. elegans*, d'autres protéines maternelles répriment la traduction de l'ARNm *glp-1* en se liant à sa région non traduite en 3'.

Après le second clivage les deux cellules ABa et ABp contiennent GLP-1. Celles-ci vont acquérir des identités différentes grâce à un signal inducteur local envoyé à ABp par la cellule P_2 au stade quatre cellules (Fig. 6.9). Ce signal dépend d'un contact cellulaire : il est délivré par APX-1 (produit par la cellule P_2) qui agit comme un ligand activant GPL-1 situé sur la membrane de la cellule ABp. Comme résultat de cette induction, les descendantes de ABa et ABp répondent différemment aux signaux tardifs des descendants de la lignée EMS.

La cellule EMS donne deux cellules filles MS et E qui sont respectivement à l'origine de mésoderme et de l'endoderme (voir Fig. 6.4). La spécification de la cellule EMS comme précurseur d'endomésoderme implique aussi des déterminants maternels localisés dans cette dernière et des signaux inducteurs en provenance de la cellule voisine P, (voir Fig. 6.9). Un déterminant maternel intervenant dans le devenir endomésodermique de EMS est le facteur de transcription SKN-1, produit du gène skn-1 (pour skin excess). L'ARNm skn-1 est distribué uniformément au stade deux cellules, mais il y a beaucoup plus de protéine SKN-1 dans le noyau de P, que dans celui de AB. Des mutations à effet maternel qui abolissent la fonction de *skn-1* font que EMS devient mésoectodermique, c'est-à-dire que son développement est plus proche de celui de sa sœur P, (voir Fig. 6.4) en donnant du mésoderme (muscles pariétaux corporels) et de l'hypoderme (d'où le nom de *skin excess* pour le mutant *skn-1*), mais pas de cellules pharyngiennes et, chez la plupart des mutants, pas d'endoderme. SKN-1 agit en activant l'expression des gènes med-1 et med-2 qui codent des facteurs de transcription nécessaires pour le devenir de MS et qui contribuent à celui de E, en parallèle avec d'autres apports maternels.

La formation d'endoderme à partir de la cellule EMS nécessite aussi un signal inducteur et est donc un autre exemple d'interactions cellulaires dans un système basé sur le lignage. Si une cellule EMS est écartée de l'influence de ses voisines vers la fin du stade quatre cellules, isolée, elle peut produire des structures intestinales, mais si sa mise à l'écart est faite au début de ce stade, elle ne produit pas ces structures. Le fait de prélever P_2 au début du stade quatre cellules entraîne l'absence de formation du tube digestif, indiquant que P_2 est la cellule gui délivre le signal inducteur. Ceci est confirmé par la recombinaison des cellules EMS et P2 isolées qui restaure le développement de l'endoderme, alors que celle de EMS avec les autres cellules du stade quatre cellules, n'a pas d'effet. Le signal de P_2 vers EMS est une protéine Wnt (MOM-2) qui interagit avec le récepteur Frizzled (MOM-5) présent à la surface de EMS (voir Fig. 6.9), le point de contact spécifiant la future cellule postérieure qui sera la cellule E. La signalisation par P_2 sert ainsi à casser deux symétries dans l'embryon : P_2 rend



Fig. 6.9 La cellule P2 est à l'origine de signaux inducteurs qui déterminent la polarité antéro-postérieure et le devenir cellulaire. ABp devient différente de ABa suite à un signal provenant de la cellule voisine P, et correspondant à la protéine de type Delta (APX-1) qui interagit avec le récepteur de type Notch (GLP-1) présent à la surface de la cellule ABp. P2 envoie également un signal inducteur de type Wnt (MOM-2), vers la cellule EMS au niveau de laquelle il interagit avec un récepteur de type Frizzled (MOM-5) et qui instaure une différence postérieure dans la cellule qui déterminera des destinées différentes pour les cellules filles antérieure et postérieure. Ces interactions reposent sur des contacts cellulaires.

Illustration d'après Mello, C.C. : The maternel genes apx-1 et glp-1 and establishment of dorsal-ventral polarity in the early C. elegans embryo. Cell 1994, 77 : 95-106.



Fig. 6.10 Le devenir cellulaire est lié au patron des divisions cellulaires. La figure illustre une partie des lignées cellulaires générées par le blastomère MS, qui est à l'origine des muscles corporels et des cellules mésodermiques du pharynx. Chaque division donne une cellule antérieure (a) et une cellule postérieure (p). La lignée paapp, par exemple, donne toujours une cellule qui entame une mort cellulaire programmée et qui meurt par apoptose (voir Encart 6A). Par ailleurs, la lignée paapaaa, donne toujours une cellule pharyngienne. différents ABp et ABa, et aussi polarise la cellule EMS de telle manière que celle-ci en se divisant, produit une cellule postérieure E et une antérieure MS.

Il est ainsi possible d'entrevoir comment une combinaison d'interactions entre les cellules et des déterminants cytoplasmiques spécifient le devenir cellulaire à des stades précoces du développement chez l'embryon de nématode. Le résultat de destruction cellulaire ciblée par laser au stade 32 cellules, autour du moment où débute la gastrulation, suggère que de nombreuses lignées sont déjà déterminées, car lorsqu'une cellule est détruite à ce stade, elle ne peut pas être remplacée et ses descendants sont absents. Les interactions intercellulaires sont, cependant, de nouveau nécessaires plus tard pour effectuer des différenciations cellulaires terminales.

6.5 La différenciation cellulaire chez le nématode est étroitement liée au patron des divisions cellulaires

Chaque blastomère d'un jeune embryon de *C. elegans* entreprend une série de division unique et presque invariante qui successivement séparent les cellules en cellules filles antérieures et postérieures. La destinée cellulaire semble être spécifiée par le fait que la cellule finale différenciée descend de la cellule antérieure a ou postérieure p à chaque division. Dans la lignée générée à partir du blastomère MS, par exemple, la cellule résultant de la séquence p-a-a-p-p entre en apoptose (Fig. 6.10) alors que celle résultant de p-a-a-p-a-a-a donne naissance à un type particulier de cellule pharyngienne. Quelle relation causale existe-t-il entre le patron de division et la différenciation cellulaire ?

Une réponse semble pouvoir être donnée avec le fait que la cellule fille antérieure présente une forte concentration nucléaire du facteur de transcription maternel POP-1, comparée à sa sœur postérieure. Dans le cas du blastomère EMS, par exemple, résultant de sa division asymétrique, sa cellule fille antérieure MS possède une quantité intranucléaire de POP-1 plus élevée que sa sœur E. Dans des embryons qui ne possèdent pas de protéine POP-1 (à cause d'une mutation à effet maternel de *pop-1*), MS adopte une identité du type E car la distinction antéro-postérieure a disparu.

POP-1 est l'homologue chez C. elegans du facteur de transcription TCF des vertébrés. Dans la voie de signalisation canonique Wnt, la β-caténine entre dans le noyau suite à la réception par la cellule du signal Wnt, interagit avec TCF et le convertit de répresseur en activateur transcriptionnel (voir Encart 4B). La distribution différentielle de POP-1 dans les cellules filles de EMS est le résultat final du signal Wnt (MOM-2) émis par P, qui agit sur le récepteur Frizzled (MOM-5) présent dans la membrane de la cellule EMS (voir Fig. 6.9). Cette voie « asymétrique » Wnt/POP- $1/\beta$ -caténine n'a pas été trouvée chez la drosophile ou les vertébrés. Cette voie possède deux branches qui contrôlent indépendamment les actions des deux β -caténines spécifiques du nématode, WRM-1 et SYS-1. Le signal Wnt MOM-2 reçu à l'extrémité postérieure de la cellule EMS la polarise, entraînant la localisation différentielle de facteurs cytoplasmiques contrôlant la voie Wnt dans les cellules filles antérieure MS et postérieure E après division cellulaire. Comme résultat de cette localisation, un complexe formé de WRM-1 et d'une protéine kinase (LIT-1) s'accumule dans le noyau de E, ce qui conduit à la phosphorylation de POP-1 et à son exportation hors du noyau (Fig. 6.11). L'autre β-caténine, SYS-1, s'accumule également dans le noyau antérieur et est capable d'agir comme un co-activateur des quantités réduites de POP-1 et aide à allumer les gènes spécifiant l'endoderme. D'autre part, dans la cellule MS, WRM-1-LIT-1 est exporté hors du noyau, gardant ainsi POP-1 à des niveaux élevés et supprimant le devenir endodermique.

La voie asymétrique Wnt/β-caténine est estimée être un mécanisme général de la régulation des destinées antérieures et postérieures des cellules au cours du développement du nématode, en allumant différents gènes cibles dans diverses situations. Cette voie Wnt/POP-1 est utilisée de manière répétée dans beaucoup d'attributions de destinées cellulaires liées aux divisions cellulaires chez *C. elegans*.

Au stade gastrula de 80 cellules, une carte des territoires présomptifs de l'embryon de nématode peut être établie (Fig. 6.12). À ce stade, les cellules des différentes lignées qui participent à la formation d'un même organe, tel que le pharynx, se regroupent. L'intestin se développe d'une façon clonale à partir des seules cellules dérivées de E. Les gènes qui paraissent contrôler l'identité des organes peuvent maintenant être



Fig. 6.11 La voie asymétrique Wnt/β-caténine de *Caenorhabditis* détermine les destinées cellulaires postérieures et antérieures dans les cellules MS et E. Le signal Wnt (MOM-2) initialement reçu par les récepteurs Frizzled (MOM-5) sur le côté postérieur de la cellule EMS (non montré ici) installe des différences antéro-postérieures dans la cellule EMS qui deviennent visibles dans ses cellules filles antérieure MS et postérieure E. POP-1 est l'homologue chez *C. elegans* du facteur de transcription TCF. SYS-1 et WRM-1 sont des β-caténines spécifiques des nématodes. Dans la cellule E, SYS-1 est stabilisée et s'accumule dans le noyau. De plus, un complexe constitué de WRM-1 et de la protéine kinase LIT-1 s'accumule aussi dans le noyau et phosphoryle POP-1. Ceci conduit à l'exportation de POP-1 hors du noyau de la cellule E, réduisant sa quantité à un niveau pour lequel SYS-1 peut agir comme co-activateur de POP-1 et allumer des gènes cibles spécifiques de l'endoderme. Dans les cellules MS, en revanche ni SYS-1 ni le complexe WRM-1-LIT-1 ne s'accumule dans le noyau et la quantité de POP-1 restant de ce fait élevée, les gènes cibles restent réprimés.

Illustration d'après Mello, C.C. : **The maternel genes apx-1 et glp-1 and establishment of dorsal-ventral polarity in the early C. elegans** *embryo.* Cell 1994, **77** : 95-106.

exprimés par les différents groupes de cellules. Le gène *pha-4*, par exemple, semble être un gène d'identité d'organe pour le pharynx. Des mutations de *pha-4* se soldent par l'absence du pharynx, cependant qu'une expression ectopique du gène *pha-4* dans toutes les cellules de l'embryon conduit à ce que toutes les cellules expriment des marqueurs cellulaires pharyngiens.

6.6 Les gènes Hox spécifient les identités de position le long de l'axe antéropostérieur chez *Caenorhabditis elegans*

Le plan corporel du nématode est très différent de celui des vertébrés ou de la drosophile, et il n'existe pas de patron métamérisé le long de l'axe antéro-postérieur. Néanmoins, comme chez les autres organismes, les gènes Hox sont impliqués dans la spécification de l'identité de position le long de cet axe. Le nématode contient un grand nombre de gènes à homéoboîtes, dont seulement six sont orthologues de ceux des complexes des gènes Hox de la drosophile ou des vertébrés. Quatre de ces gènes, *lin-39, ceh-1, mab-5* et *egl-5*, sont relativement proches les uns des autres, avec les deux restants, *php-3* et *nob-1*, situés sur le même chromosome à quelque distance des précédents. Des comparaisons avec d'autres espèces de nématodes indique la perte de gènes Hox et la perturbation du complexe génique ancestral Hox dans la lignée évolutive menant à *C. elegans* et à ses parents proches.

Parmi les gènes Hox de *C. elegans*, seul *ceh-13*, qui est requis pour l'organisation antérieure, est essentiel pour le développement embryonnaire, et il semble que les autres gènes Hox n'exercent leurs fonctions dans la spécification régionale qu'à des stades larvaires. À l'exception de *ceh-13*, l'ordre des gènes sur le chromosome se reflète dans leurs profils d'expression spatiaux, comme cela est montré pour trois gènes Hox dans la Fig. 6.13. *lin-39* paraît contrôler le devenir des cellules dans la partie centrale du corps et régule le développement de la vulve chez les hermaphrodites





Fig. 6.12 Carte des territoires présomptifs d'une gastrula de 80 cellules de

Caenorhabditis elegans. En haut (a), les régions de l'embryon ont une coloration codée selon leurs blastomères d'origine. En (b) les régions sont colorées selon les organes ou tissus qu'elles donneront. À ce stade du développement, les cellules de différentes lignées qui contribuent à la formation d'un même tissu ou organe sont regroupées dans l'embryon. A des fins de clarté, les domaines occupés par ABpra et ABprp ne sont pas montrés dans la figure a. La région antérieure est à gauche et la ventrale est en bas.

D'après Labouesse, M. et Mango, S. E. : Patterning the C. elegans embryo : moving beyond the cell lineage. Trends Genet. 1999, 15 : (8)8, 307-313.

Fig. 6.13 Le complexe de gènes Hox de *Caenorhabditis elegans* et ses relations avec le complexe HOM-C de la drosophile.

Le nématode possède un complexe de six gènes Hox, quatre d'entre eux présentant des homologies bien définies avec des gènes Hox particuliers de la mouche. Les profils d'expression de trois des gènes sont montrés au niveau de la larve.

Illustration d'après Bürglin, T.R., Ruvkun, G. : The Caenorhabditis elegans homeobox gene cluster. Curr. Opin. Gen. Dev. 1993, 3 : 615-620.



(voir plus loin dans ce chapitre), tandis que *mab-5* contrôle le développement d'une région légèrement plus postérieure, et que *egl-5* procure une information de position pour les structures postérieures. *php-3* et *nob-1* constituent aussi un groupe de gènes postérieurs. Comme pour les autres organismes, des mutations de gènes Hox font que des cellules d'une région corporelle adoptent des destinées caractéristiques d'autres régions. Par exemple, une mutation de *lin-39* conduit des cellules de la partie centrale d'une larve à exprimer des traits caractéristiques de régions plus antérieures ou postérieures.

Malgré le fait que les gènes Hox chez le nématode ont des expressions régionalisées, celles-ci peuvent ne pas être dépendantes du lignage. Par exemple, chez la larve, toutes les cellules exprimant le gène Hox *mab-5* sont dans la même région (voir Fig. 6.13) mais sont de lignées relativement éloignées. L'expression de *mab-5* est due à des signaux de position extracellulaires.

6.7 La chronologie des événements marquant le développement du nématode est sous un contrôle génétique qui implique des microARN

Le développement embryonnaire aboutit à l'éclosion d'une larve de 558 cellules et est suivi de quatre stades larvaires avant qu'un adulte ne se forme. En raison du fait que chaque cellule peut être identifiée par son lignage et sa position, les gènes qui contrôlent la destinée de chaque cellule à des temps spécifiques du développement peuvent aussi être identifiés. Cela permet d'étudier facilement le contrôle génétique du développement chez *C. elegans*. L'ordre dans lequel les processus se succèdent est d'une importance centrale, de même que les moments où ils se produisent. Les gènes doivent s'exprimer à la fois à la bonne place et au bon moment. Un exemple bien étudié du développement du nématode est l'apparition des différents patrons de division cellulaire et de différenciation pendant les quatre stades larvaires de *C. elegans* qui se reconnaissent facilement par le développement de leur cuticule.

Des mutations d'un petit nombre de gènes chez *C. elegans* modifient la chronologie des divisions cellulaires dans beaucoup de tissus et types cellulaires. Les mutations qui altèrent la chronologie du développement sont dites **hétérochroniques**. Les deux premiers gènes hétérochroniques découverts chez *C. elegans* sont *lin-4* et *lin-14*, et ceux-ci seront utilisés pour illustrer à la fois le phénomène d'hétérochronie et le contrôle de ce dernier par des microARN. Des mutations de l'un ou l'autre de ces gènes font que le développement est soit retardé soit avancé.

Les changements dans le déroulé du développement résultant de mutations de *lin-14* peuvent être illustrés par ce qui se produit au niveau du lignage cellulaire T (Fig. 6. 14). Chez les individus de type sauvage, les cellules T.ap sont à l'origine de cellules de l'hypoderme, de neurones et de leurs cellules de soutien selon un programme de divisions cellulaires stéréotypées dans les larves L1 et L2. Durant les stades larvaires L3 et L4, certaines descendantes des cellules se divisent davantage pour donner d'autres structures adultes. Des mutations de perte de fonction de *lin-14* conduisent à un développement accéléré, comme par exemple, la perte du programme des divisions vu en L1 et un développement post-embryonnaire qui débute avec des divisions cellulaires observées normalement en L2. Au contraire, des mutations de gain de fonction de *lin-14* provoquent un développement retardé. Le développement post-embryonnaire



Fig. 6.14 Patrons des lignages cellulaires chez le type sauvage et les mutants hétérochroniques de Caenorhabditis elegans. La lignée de la cellule progénitrice (T.ap) se poursuit pendant les quatre stades larvaires (à gauche). Les mutants du gène *lin-14* montrent une perturbation dans la chronologie des divisions cellulaires, entraînant des modifications dans les patrons de lignage cellulaire. Des mutations de perte de fonction provoquent une accélération du développement, avec une perte des lignages des stages précoces (au centre). Des mutations de gain de fonction entraînent un retard avec une répétition des patrons des stades larvaires précoces (à droite).

commence normalement, mais les programmes des divisions cellulaires du premier ou second stade larvaire se répètent.

Les gènes qui contrôlent la chronologie du développement pourraient le faire en provoquant la baisse de la concentration de certaines substances avec le temps (Fig. 6.15). Ce gradient temporel pourrait exercer un contrôle du développement de la même façon que le font des gradients spatiaux. Ce type de mécanisme semble se manifester chez *C. elegans*, car la concentration de la protéine LIN-14 chute d'un facteur 10 entre le premier stade larvaire et les stades plus tardifs. Les différences de concentration de LIN-14 à différents stades du développement pourraient spécifier la destinée des cellules, avec des hautes concentrations spécifiant les destinées précoces et les basses celles plus tardives. Ainsi, la décroissance de LIN-14 durant le développement pourrait être à l'origine d'une séquence temporelle précisément ordonnée d'activités cellulaires. Des mutations dominantes de gain de fonction de *lin-14* maintiennent LIN-14 à des niveaux élevés, et chez ces mutants, les cellules continuent de se comporter comme si elles étaient à un stade larvaire plus précoce. À l'opposé, les mutations de perte de fonction conduisent à des concentrations de LIN-14 anormalement basses, et les larves alors se comportent comme si elles étaient à un stade plus âgé.

La chronologie du développement chez *C. elegans* a été l'un des premiers processus impliquant une régulation de l'expression génique par des microARN (Encart 6C). L'expression de *lin-14* est contrôlée post-transcriptionnellement par un microARN transcrit à partir du gène *lin-4*, qui réprime la traduction de l'ARNm *lin-14* et donc fait diminuer la concentration de LIN-14. LIN-14 est un facteur de transcription, mais aucun de ses gènes cibles n'a été identifié jusqu'à présent pouvant expliquer ses phénotypes perte de fonction et gain de fonction hétérochroniques. L'augmentation de la synthèse d'ARN *lin-4* durant les stades tardifs larvaires génère le gradient temporel de LIN-14, comme l'indique le fait que les mutations de perte de fonction de *lin-4* ont le même effet que les mutations de gain de fonction de *lin-14*. L'expression d'un autre gène impliqué dans le processus, *lin-41*, est aussi régulée post-transcriptionnellement par un autre microARN, *let-7*, qui réprime sa traduction.

Fig. 6.15 Un modèle pour le contrôle de la chronologie du développement larvaire de *Caenorhabditis elegans*. En haut : les stades spécifiques du développement larvaire sont déterminés par un gradient temporel de la concentration de la protéine LIN-14 qui décroît durant le développement larvaire. Une haute concentration à des stades précoces spécifie un patron du développement larvaire précoce normal comme il est montré dans la figure 6.14 (à gauche). La baisse de la quantité de LIN-14 dans des stades plus tardifs est due à l'inhibition de la traduction des ARNm *lin-14* par le microARN *lin-4*. En bas : des mutations de perte de fonction (pf) de *lin-14* provoquent l'absence du lignage du premier stade larvaire L1, alors que des mutations de gain de fonction (gf), qui maintiennent un niveau élevé de LIN-14 pendant tout le développement, entraînent le maintien du lignage de la forme larvaire L1. Les pertes de fonction de *lin-4* se soldent par la levée de la répression exercée sur *lin-14*, la persistance d'une activité élevée de LIN-14, et une répétition du lignage L1.







Figure 1

Une nouvelle catégorie de gènes impliqués dans le développement a été reconnue relativement récemment, qui ne codent pas des protéines mais permettent la production de petits ARN non codants appelés microARN (miARN). Ceux-ci régulent l'expression génique en empêchant la traduction d'ARNm spécifiques. Cette méthode d'extinction génique naturelle a des similitudes avec celle décrite dans l'Encart 6B impliquant des petits ARN interférents (siRNA), mais elle relève, bien qu'il y ait un certain recoupement entre les processus impliqués, d'un phénomène semble-t-il différent. Les microARN ont été identifiés en premier chez C. elegans comme les produits des gènes let-7 et lin-4, qui contrôlent le déroulement temporel du développement (voir le texte). Les rôles joués dans le développement sont connus pour un petit nombre d'autres miARN chez les nématodes, et pour le miARN bantam qui empêche la mort cellulaire chez la drosophile. Il y a maintenant des preuves que beaucoup de gènes humains permettent la production de miARN et que ceux-ci exercent des rôles régulateurs qui ont été révélés dans le cancer.

Le transcrit primaire d'un miARN comporte plusieurs centaines de nucléotides et contient une répétition inverse de la séquence du miARN mature. Après épissage initial dans le noyau, le transcrit se replie sur lui-même pour former un ARN double brin en épingle à cheveux, le pré-miARN, qui est exporté vers le cytoplasme (voir Figure 1) et y est clivé par l'enzyme Dicer, ce qui produit un court miARN simple brin d'environ 22 nucléotides. Comme pour l'ARN interférent, le miARN est incorporé en tant que guide d'un complexe protéique RISC (voir Encart 6B) ayant pour cible un ARNm spécifique. À la différence des siRNA, les miARN des espèces animales ne sont pas parfaitement complémentaires de leur cible ARNm et n'ont que quelques bases pouvant s'hybrider à l'ARNm cible. Fixé à sa cible, le complexe protéique rend inactif l'ARNm, empêche sa traduction, et le dégrade. Les miARN peuvent aussi réprimer la transcription des gènes.

D'autres ARN non codants ont un rôle dans la régulation de l'expression génique, mais opèrent de façon différente en se fixant physiquement aux chromosomes pour bloquer l'expression. C'est le cas de l'ARN *Xist*, évoqué dans le Chapitre 10, qui est impliqué dans l'**inactivation du chromosome X** chez les mammifères.

6.8 Le développement de la vulve est initié par l'induction d'un petit nombre de cellules due à des signaux à courte portée émis par une cellule inductrice unique

La vulve forme l'organe génital externe du ver hermaphrodite adulte et est connectée à l'utérus. C'est un exemple important d'une structure qui est initialement spécifiée à partir d'un nombre réduit de cellules, seulement quatre cellules, une inductrice et les trois autres induites. À la différence d'autres aspects du développement de *Caeno-rhabditis* évoqués jusqu'à présent, la vulve est une structure adulte qui se développe au cours du dernier stade larvaire. Mature, elle est constituée de 22 cellules, avec de nombreux types cellulaires différents, et plus de 40 gènes sont impliqués dans son développement. Elle dérive de cellules ectodermiques originaires du blastomère AB. Six de ces cellules progénitrices, les cellules P (à ne pas confondre avec le P désignant les cellules postérieures de l'embryon précoce) persistent chez la larve en une rangée alignée antéro-postérieurement sur le côté ventral de la larve, et les filles postérieures de trois d'entre elles, P5p, P6p et P7p sont à l'origine de la vulve, chacune d'elle ayant un lignage bien défini. Une des fonctions du gène Hox *lin-39* est d'éviter la fusion des



Fig. 6.16 Développement de la vulve de nématode. La vulve se développe à partir de trois cellules, P5p, P6p et P7p durant les stades post-embryonnaires du développement du nématode. Sous l'influence d'une quatrième cellule, la cellule ancre, P6p s'engage dans une voie de différenciation primaire donnant naissance à huit cellules vulvaires. P6p a pour voisines directes P5p et P7p, qui entreprennent chacune une voie de différenciation secondaire à l'origine de sept cellules vulvaires de différents types. Les trois autres cellules P voisines suivent une destinée tertiaire et donneront de l'hypoderme.

cellules P pour former de l'hypoderme durant les stades précoces larvaires, qui est le devenir des autres cellules ectodermiques ventrales de cette lignée.

Concernant le développement de la vulve, trois destinées cellulaires sont conventionnellement distinguées, dites primaire, secondaire et tertiaire. Les deux premières destinées se réfèrent aux différents types cellulaires de la vulve, tandis que la destinée tertiaire n'est pas vulvaire. P6p est normalement à l'origine de la lignée primaire alors que P5p et P7p donnent naissance aux lignées secondaires. Les trois autres cellules P sont à l'origine de la lignée tertiaire, se divisent une fois et fusionnent pour former l'hypoderme (Fig. 6.16). Cependant, les six cellules P sont initialement équivalentes dans leur capacité à être des cellules de la vulve. Une des questions posées ici est comment les trois cellules finales ont-elles été sélectionnées en tant que cellules précurseuses de la vulve.

Le destin des trois cellules précurseurs de la vulve est fixé par un signal inducteur provenant d'une quatrième cellule, la cellule ancre gonadique, qui confère à P6p, la plus proche d'elle, une destinée primaire, et aux cellules voisines de celle-ci, P5p et P7p, une destinée secondaire (voir Fig. 6.16). Une fois induite, P6p empêche ses voisines immédiates d'adopter une destinée primaire. Les cellules P qui ne reçoivent pas de signal de la cellule ancre adoptent une destinée tertiaire.

Après induction, le lignage des cellules P est fixé. Si une des cellules filles est détruite, les autres ne changent pas leur devenir. Il n'y a pas de preuve d'interactions cellulaires au cours du développement ultérieur de ces trois lignées de cellules P, et les identités des cellules filles sont probablement spécifiées par des divisions asymétriques. La vulve est formée de 22 cellules dérivées de ces lignées selon un patron précis de division cellulaire, de mouvement et de fusion cellulaire, aboutissant à une structure de sept couches concentriques empilées les unes sur les autres pour former une structure conique (Fig. 6.17).

Comment seulement trois cellules Pp sont-elles spécifiées, et comment le devenir primaire de la cellule centrale se différencie-t-il du devenir secondaire de ses voisines ? Les six cellules Pp sont initialement équivalentes, ce qui veut dire que chacune d'elles peut être à l'origine d'un tissu vulvaire. Le signal clé déterminant est fourni par la cellule ancre. Le rôle vital de celle-ci est montré par des expériences d'ablation cellulaire, la vulve ne se développant pas quand la cellule ancre est détruite par un microfaisceau laser.

Des voies de signalisation bien connues sont impliquées dans l'induction de la vulve. Le signal de la cellule ancre est une protéine sécrétée codée par le gène *lin-3*, homologue des facteurs de croissance EGF d'autres espèces. Des mutations de *lin-3* causent la même anomalie que celle observée si la cellule ancre est détruite, à savoir l'absence de formation d'une vulve. Le récepteur du signal inducteur est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase de la famille du récepteur de l'EGF (EGFR), codé par le gène *let-23* (Fig. 6.18). Le signal inducteur de la cellule ancre active la





la vulve en cours de formation. La séquence de (a) à (d) montre la morphogenèse de la vulve sur une période de 5 heures, à partir de 34 heures. Les changements de forme des cellules et les fusions cellulaires donnent naissance à la structure conique observée dans le schéma de gauche.

D'après Sharma-Kishore R. et al. : Formation of a vulva in Caenorhabditis elegans : a paradigm for organogenesis. Development 1999, 126 : 691-699.

voie de signalisation intracellulaire du EGFR le plus fortement dans P6p, et à un degré moindre dans P5p et P7p. Cette plus forte activation de la voie dans P6p conduit celle-ci à adopter un devenir primaire, cependant qu'un signal d'un niveau plus faible est donné aux cellules P5p et P7p. P6p envoie ensuite un signal d'inhibition latérale empêchant ses deux voisines d'accéder à un devenir primaire, et promouvant pour elles un devenir secondaire. Ce signal est constitué de trois protéines de la famille Delta qui interagissent avec le récepteur transmembranaire LIN-2, un membre de la famille Notch, présent à la surface de P5p et P6p. La voie de signalisation canonique What (voir Encart 4B), impliquant une troisième β -caténine de *C. elegans* (BAR-1), intervient dans l'adoption de la destinée cellulaire en réponse à ce signal.

Chez les nématodes, le développement de la vulve présente plusieurs variantes, une mineure et une majeure, résultant de divergences et de convergences évolutives au sein de ce grand groupe d'organismes. Bien que la vulve ait la même forme chez toutes les espèces étudiées et qu'elle soit dérivée pour beaucoup du même petit lot de cellules P, certaines espèces ont une vulve localisée postérieurement alors que chez d'autres, comme C. elegans, elle est située en position centrale. Le mécanisme



dans le développement de la vulve. La cellule ancre émet un signal diffusible LIN-3 qui, réceptionné par le récepteur LET-23, induit une destinée primaire pour la cellule précurseur la plus près d'elle. Il induit aussi une destinée secondaire pour les deux cellules P situées légèrement plus loin, là où la concentration du signal est plus faible. La cellule possédant une destinée primaire inhibe les cellules contiguës à s'engager dans cette destinée par un mécanisme d'inhibition latérale impliquant LIN-12, et induit aussi une destinée secondaire pour ces cellules. Un signal constitutif issu de l'hypoderme inhibe le développement des destinées primaire et secondaire, mais il est annulé par le signal

Fig. 6.18 Interactions intercellulaires

particulier de l'induction de la vulve chez *C. elegans*, chez lequel le devenir général de la vulve et le devenir primaire cellulaire sont induits au même moment par un signal issu d'une seule cellule ancre gonadique, est le résultat d'une évolution très récente et est probablement apparu avec le genre *Caenorhabditis*. Les autres espèces de nématodes ont des mécanismes d'induction de la vulve variés qui diffèrent de celui de *C. elegans* de manière plus ou moins importante.

RÉSUMÉ

La spécification des destins cellulaires chez l'embryon de nématode est intimement liée au patron des divisions cellulaires et fournit un excellent exemple des relations subtiles entre des différences cytoplasmiques spécifiées maternellement et des interactions très localisées entre cellules voisines. L'axe antéro-postérieur est spécifié lors du premier clivage par le site de pénétration du spermatozoïde et les axes dorso-ventral et gauche droite impliquent des interactions locales entre les cellules. Des produits de gènes sont asymétriquement distribués au cours des premiers stades de la segmentation, mais la spécification des destinées cellulaires chez l'embryon précoce est fortement dépendante d'interactions intercellulaires locales, qui se font par le biais des signalisations Wnt et Delta-Notch. Le développement de l'intestin qui dérive d'une seule cellule, requiert un signal inducteur d'une cellule voisine. Un petit complexe de gènes à homéoboîte code l'information de position le long de l'axe antéro-postérieur de la larve. La chronologie des événements du développement chez la larve est contrôlée par des changements dans les niveaux de plusieurs protéines LIN qui diminuent dans le temps suite à une répression post-transcriptionnelle due à des microARN. La formation de la vulve du nématode adulte implique à la fois un lignage cellulaire bien défini et des interactions cellulaires inductrices impliquant les voies de signalisation EGF et Notch. Le détail des mécanismes du développement vulvaire varie selon les espèces de nématodes.



Échinodermes

Les échinodermes incluent notamment les oursins et les étoiles de mer. De par leur transparence et leur manipulation aisée, les embryons d'oursin ont longtemps été un modèle très utilisé en biologie du développement. Les échinodermes sont beaucoup plus proches d'un point de vue phylogénétique des vertébrés que ne le sont d'autres espèces modèles non-vertébrés comme la drosophile ou *Caenorhabditis elegans*. Les échinodermes sont en effet, comme les vertébrés, des **deutérostomiens**. Les animaux qui appartiennent à cette lignée évolutive sont des cœlomates, avec un clivage radiaire et chez lesquels l'invagination primaire du tube digestif lors de la gastrulation forme l'anus, la bouche se formant indépendamment. Les arthropodes (qui incluent la drosophile) et les nématodes appartiennent à la lignée des **protostomiens** qui comprennent des animaux chez lesquels le clivage n'est pas radiaire et la gastrulation forme primitivement la bouche.

Si les embryons d'oursin ont été pour Hans Driesch un système expérimental de choix ayant permis de mettre en évidence l'existence de la régulation embryonnaire (Section 1.3), néanmoins pendant de nombreuses années, l'étude du développement de l'oursin a connu un certain désintérêt, en bonne partie dû à l'impossibilité de mener chez ces animaux les approches génétiques classiques ou les techniques de transgenèse qui se sont généralisées dans d'autres modèles. Avec le développement de nouvelles techniques d'analyse fonctionnelle et la possibilité d'identifier des gènes sur la base de leur homologie avec ceux d'autres espèces, il est devenu possible d'étudier aux niveaux moléculaires et génétiques le développement des oursins qui sont redevenus des modèles importants de la biologie du développement actuelle. Le génome de l'oursin pourpre *Strongylocentrotus purpuratus* a été complètement séquencé et de nombreuses études ont permis d'obtenir une vision assez complète du réseau de régulation génétique qui contrôle le développement précoce de cet animal.

6.9 Le développement embryonnaire de l'oursin donne naissance à une larve nageuse

L'œuf fécondé de l'oursin est entouré d'une double enveloppe au sein de laquelle l'embryon va se développer jusqu'au stade blastula. Après éclosion, la blastula entame la gastrulation et produit une larve nageuse à symétrie bilatérale appelée **pluteus**. Cette larve se métamorphose par la suite en un adulte ayant une symétrie radiaire (Fig. 6.19). Les études du développement de l'oursin portent essentiellement sur le développement précoce et la formation de la larve, la métamorphose, phénomène complexe n'ayant été que très peu étudié.

Le clivage chez l'oursin est radiaire. Les deux premières divisions sont dites méridiennes, c'est-à-dire qu'elles se font avec des plans de division contenant l'axe animalvégétatif de l'embryon (Fig. 6.20). Le troisième plan de clivage est équatorial et divise l'embryon en une partie animale et une partie végétative. Ces trois premiers clivages sont symétriques et donnent naissance à huit cellules de même taille. Lors du quatrième cycle de clivage, les quatre cellules animales se divisent à nouveau de manière égale et méridienne. Dans la partie végétative, les divisions sont en revanche asymétriques (inégales) et perpendiculaires à l'axe animal-végétatif, ce qui produit quatre **macromères**, qui contiennent près de 95 % du cytoplasme de leurs cellules mères, et quatre **micromères** beaucoup plus petits et situés au pôle végétatif de l'embryon. Lors du cinquième cycle de clivage, les micromères se divisent de manière asymétrique, produisant quatre micromères de taille réduite sur lesquels reposent quatre micromères plus volumineux. Les divisions se poursuivent et résultent en la formation d'une blastula sphérique et creuse, composée d'environ 1 000 cellules ciliées formant un épithélium qui entoure une cavité, le blastocœle.

La gastrulation de l'oursin, dont les mécanismes sont détaillés dans le Chapitre 9, commence environ dix heures après la fécondation avec l'internalisation du mésoderme et de l'endoderme dans la partie végétative de l'embryon. Chez *S. purpuratus*, la gastrulation débute par l'entrée dans le blastocœle d'environ 32 cellules mésodermiques (mésenchyme primaire) au pôle végétatif de l'embryon (Fig. 6.20). Ces cellules migrent sur la face interne de la paroi de la blastula,





constituant un anneau végétatif de cellules qui forment le squelette interne de la larve en déposant des spicules calcaires. L'endoderme et d'autres cellules mésodermiques (mésenchyme secondaire) s'invaginent ensuite au niveau du pôle végétatif. L'**invagination**, décrite en détail dans le Chapitre 9, est un mouvement d'ensemble d'une population de cellules qui s'internalise sans qu'il y ait disparition du caractère épithélial du tissu.

Le tissu invaginé progresse à l'intérieur du blastocœle et les cellules du mésenchyme secondaire, après s'être détachées de sa partie terminale, migrent individuellement dans le blastocœle et produisent divers dérivés mésodermiques comme les cellules musculaires et pigmentaires. La partie antérieure de l'endoderme invaginé fusionne ensuite avec une petite invagination ventrale et antérieure de l'ectoderme, qui correspond à la région de la future bouche. À ce stade, l'embryon est devenu une larve pluteus, dotée d'un tube digestif avec bouche et anus, capable de se nourrir. Dans la suite, la mise en place des différentes structures le long des deux axes de la larve d'oursin sera examinée et il sera constaté que, malgré les grandes différences morphologiques avec les vertébrés, des mécanismes et circuits génétiques similaires sont à l'œuvre.

6.10 L'œuf de l'oursin est polarisé suivant l'axe animal-végétatif

Deux axes de polarité sont généralement définis dans les embryons d'oursin, l'axe animal-végétatif et l'axe **oral-aboral** (Fig. 6.20). L'axe oral-aboral, défini par la position de la bouche (pôle oral) et établi après la fécondation et lors du clivage précoce, détermine avec l'axe animal-végétatif pré-existant, le plan de symétrie bilatérale de la larve. Une polarité animale-végétative, déjà présente avant la fécondation dans l'ovule, semble liée au site d'attachement de l'ovocyte dans l'ovaire. La polarité se marque, chez certaines espèces, par la présence d'un fin canal au pôle animal ou d'une bande de granules pigmentés dans la région végétative. Le développement Fig. 6.19 Cycle de vie de l'oursin Strongylocentrotus purpuratus. Les ovules, des ovotides, libérés par la femelle sont fécondés par les spermatozoïdes dans le milieu extérieur. L'œuf fécondé produit après l'étape de clivage une blastula qui évolue, après la gastrulation et l'éclosion, en une larve pluteus. La larve se métamorphose ensuite en un adulte à symétrie radiaire. Les photographies montrent la blastula (en haut), la larve pluteus (au milieu) et l'adulte (en bas).

En haut et au milieu : photographies reproduites avec l'autorisation de J. Coffman. En bas : photographie Copyright © 2007 D. Monniaux reproduite sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported.



Fig. 6.20 Développement de l'embryon d'oursin. Schémas du haut : vues externes d'embryons du stade zygote au stade 64 cellules. L'ectoderme présomptif est en bleu, l'endoderme en jaune et le mésoderme en rouge. Un blastomère coloré avec plusieurs couleurs contribuera à la formation de plusieurs feuillets embryonnaires. Les deux premiers cycles de division se font selon des plans méridiens contenant l'axe animal-végétatif, et le troisième cycle de division s'effectue selon un plan perpendiculaire à cet axe. L'embryon est alors divisé en deux hémisphères, animal et végétatif. Au quatrième cycle, les divisions deviennent inégales dans l'hémisphère végétatif et quatre micromères se forment (en rouge ; seuls deux d'entre eux sont visibles) au pôle végétatif. Ces micromères se divisent eux-mêmes de manière inégale et génèrent quatre petits et quatre grands

micromères (seule une partie de ces cellules est représentée). Les divisions se poursuivent et une blastula creuse se forme. Schémas du bas : vues de la gastrulation et de la formation de la larve plutéus. Sections méridiennes d'embryons depuis le stade blastula jusqu'à la larve pluteus (vue depuis le pôle oral). La gastrulation débute au pôle végétatif avec l'entrée à l'intérieur de la blastula d'environ 40 cellules du mésenchyme primaire. Celles-ci produiront les baguettes calcaires qui soutiendront les bras de la larve pluteus. Le futur tube digestif s'invagine au pôle végétatif et fusionne du côté opposé avec une invagination ectodermique (future bouche). La position de la bouche définit l'axe principal de la larve, l'axe oral (O)-aboral (Ab). Les cellules du mésenchyme secondaire s'individualisent à partir de la partie antérieure de l'invagination endodermique.

précoce de l'embryon est intimement lié à l'axe animal-végétatif : les deux premiers plans de clivage contiennent toujours cet axe et lors du quatrième cycle de division, les micromères, issus des divisions inégales de leurs cellules mères, se forment toujours au pôle végétatif (Fig. 6.20). L'identité des micromères et des cellules du mésenchyme primaire auxquelles ils donnent naissance, est contrôlée par des facteurs cytoplasmiques localisés au pôle végétatif de l'œuf fécondé.

L'axe animal-végétatif est stable et ne peut pas être altéré par la centrifugation de l'œuf ou de l'embryon, qui redistribue des structures subcellulaires de grande taille comme les mitochondries ou les plaquettes vitellines. Des fragments d'œuf fécondé conservent leur polarité d'origine. Si on sépare les blastomères aux stades 2 ou 4 cellules, chacun d'entre eux, qui contient un axe animal-végétatif complet, peut produire une larve **pluteus** normale quoique de plus petite taille par rapport à la normale (Fig. 6.21 à gauche). Si deux œufs fécondés sont fusionnés avec leurs axes animal-végétatif parallèles, on obtient une larve géante mais d'organisation normale.

Ce n'est pas le cas si on sépare la partie animale de la partie végétative d'un embryon au stade 8 cellules : les quatre cellules animales produiront une sphère creuse de cellules ectodermiques ciliées sans mésoderme ni endoderme, alors que la partie végétative de l'embryon produira une larve de morphologie variable, mais caractérisée par un tube digestif élargi, la présence de spicules, peu de dérivés ectodermiques et pas de bouche (Fig. 6.21 à droite). Dans certains cas, lorsque le plan de clivage de la troisième division est légèrement déplacé vers le pôle animal, la partie végétative de l'embryon au stade 8 cellules, séparée de la partie animale, pourra même produire une larve normale.

Prises ensemble, ces observations suggèrent qu'il existe des facteurs maternels distribués de manière localisée le long de l'axe animal-végétatif et qui contrôlent l'identité animale ou végétative des cellules. L'embryon d'oursin possède néanmoins un fort pouvoir de régulation, suggérant que les interactions entre cellules sont très importantes.



6.11 La carte des territoires présomptifs de l'oursin est finement spécifiée, mais l'embryon possède néanmoins un fort pouvoir de régulation embryonnaire

Une carte simplifiée des territoires présomptifs montre l'existence de plusieurs grands domaines dans l'embryon au stade 60 cellules (Fig. 6.22). Trois régions sont observées en partant du pôle végétatif et en allant vers le pôle animal : les petits et grands micromères qui produiront une partie du mésoderme (notamment le mésenchyme primaire à l'origine du squelette de la larve) ; la plaque végétative qui comprend deux rangées de cellules appelées Veg1 et Veg2 produisant l'endoderme, du mésoderme (le mésenchyme secondaire qui forme des muscles et du tissu connectif) et un peu d'ectoderme ; le reste de l'embryon qui donne naissance à l'essentiel de l'ectoderme (dont dérivent les cellules épidermiques et neurales) subdivisé en une région **orale** et une région **aborale**.

L'utilisation de colorants vitaux a permis de cartographier les divisions cellulaires et le devenir des cellules dans l'embryon précoce. Il a été montré que le patron des divisions cellulaires est invariant, mais que, contrairement à ce qu'on observe chez *C. elegans*, ce patron stéréotypé ne détermine pas le devenir des cellules individuelles. Si un embryon précoce est comprimé à l'aide d'une lamelle de microscope, le patron des divisions cellulaires est modifié, mais l'embryon aura néanmoins une organisation normale. Lignages cellulaires et devenir des cellules sont donc largement séparables. L'embryon d'oursin montre un fort pouvoir de régulation qui n'est néanmoins pas réparti de manière uniforme : les micromères, par exemple, ont un devenir fixe qui ne peut pas être modifié. Ils ne produiront que du mésenchyme primaire et ce, même si on les greffe en position très différente de leur position d'origine. Les macromères végétatifs au moment de leur formation n'ont en revanche pas de devenir fixe. Si on colore ces cellules au stade 16 cellules, ils produiront de l'endoderme, du mésoderme et de l'ectoderme. Colorées au stade 60 cellules, les cellules Veg2 produiront de

Fig. 6.22 Carte des territoires présomptifs de l'embryon d'oursin au stade 60 cellules. L'embryon est subdivisé en trois régions le long de l'axe animal-végétatif : les micromères qui produisent le mésenchyme primaire ; la plaque végétative (cellules Veg1 et Veg2) qui est à l'origine de l'endoderme, ainsi que du mésenchyme secondaire et d'une partie de l'ectoderme ; les mésomères qui produisent la majeure partie de l'ectoderme. Le mésoderme présomptif est en rouge, l'endoderme en jaune, l'ectoderme oral (qui produit notamment le système nerveux) en bleu foncé et l'ectoderme aboral (produisant l'essentiel de l'épiderme de la larve) en bleu clair.

D'après Logan, C. Y., and McClay, D. R. : **The allocation of early blastomeres to the ectoderm** and endoderm is variable in the sea urchin embryo. Development 1997, **124** : 2213-2223. Fig. 6.21 Devenir de blastomères isolés chez l'oursin. À gauche : cultivés isolément, les blastomères du stade quatre cellules produisent une larve de taille réduite mais normale. À droite : au stade 8 cellules, un hémisphère animal isolé donne naissance à une sphère creuse d'ectoderme cilié, alors que l'hémisphère végétatif se développe en un embryon possédant généralement un tube digestif élargi, un squelette anormal et un

ectoderme réduit.



l'endoderme ou du mésoderme (mais pas d'ectoderme), alors que les cellules Veg1 produiront de l'endoderme ou de l'ectoderme (mais pas de mésoderme). Il y a donc eu à ce stade spécification de l'**endomésoderme** (aussi appelé mésendoderme), mais la limite entre l'endoderme et l'ectoderme ne sera fixée qu'un peu plus tard dans le développement. Des descendantes des cellules Veg1 marquées individuellement après le huitième cycle de division seront à l'origine d'endoderme ou d'ectoderme, mais jamais des deux.

Certaines régions de l'embryon, lorsqu'elles sont isolées, se développent de manière plus ou moins similaire à ce qui est observé dans l'embryon entier. Ainsi les micromères isolés au stade 16 cellules et mis en culture vont former du mésenchyme primaire et même parfois produire des spicules calcaires. La moitié animale de l'embryon, constituée uniquement d'ectoderme présomptif, forme une sphère épithéliale ciliée dépourvue de bouche. Ces expériences suggèrent que des facteurs cytoplasmiques sont responsables de l'identité des cellules, mais ne fournissent pas de données sur un rôle inducteur possible des interactions cellulaires lors du développement. Comme cela a déjà été relevé, la moitié végétative de l'embryon peut produire en revanche une larve quasiment normale. Un autre exemple spectaculaire de régulation embryonnaire est que la combinaison de la moitié des blastomères végétatifs et animaux d'un embryon au stade 8 cellules avec les blastomères animaux d'un autre embryon, produit un embryon qui se développe normalement. Comme cela est-il possible ? Comme il sera vu dans la partie suivante, cela est dû à la capacité de la région végétative de l'embryon à agir comme un centre organisateur, ce qui est aussi retrouvé chez d'autres espèces dont l'embryon montre un fort pouvoir de régulation.

6.12 La région végétative de l'embryon d'oursin agit comme un centre organisateur

Le pouvoir de régulation de l'embryon précoce d'oursin est très largement dû à l'existence d'un centre organisateur dans la partie végétative de l'embryon, organisateur qui, comme le centre de Spemann des embryons d'amphibiens (Fig. 4.5), a la potentialité d'induire la formation d'une larve quasi complète. Ce centre organisateur est établi grâce à l'activité de facteurs maternels et est constitué par les micromères formés lors du quatrième cycle de division de clivage. Il produit des signaux qui induisent les macromères végétatifs adjacents à adopter un devenir endomésodermique. Ces signaux mettent également en route une série d'événements successifs qui vont permettre la spécification du mésoderme et de l'endoderme, et aider à établir la frontière entre l'endoderme et l'ectoderme. L'élimination des micromères lors de leur formation au quatrième cycle de division provoque un développement anormal, mais s'ils sont prélevés au sixième cycle, après 2-3 heures de contact avec les autres blastomères, un retard de la gastrulation et un développement d'une larve normale sont observés.

Le centre organisateur de l'embryon d'oursin a été mis en évidence grâce à des expériences de greffes (Fig. 6.23). Si on combine des micromères isolés d'un embryon au stade 16 cellules avec la partie animale d'un embryon au stade 32 cellules, une larve quasi normale se forme. Les micromères ont donc été capables d'induire des cellules animales normalement ectodermiques à produire du tube digestif. De manière similaire, des micromères greffés en position latérale dans un embryon entier induisent certaines cellules normalement ectodermiques à devenir endodermiques, ce qui conduit à une invagination de la région ectodermique concernée et la formation d'un second tube digestif. Plus les micromères sont greffés près de la région végétative, plus grande sera la taille de la seconde invagination, suggérant que la capacité à répondre au signal inductif issu des micromères varie le long de l'axe animal-végétatif.

L'embryon précoce d'oursin peut compenser dans une certaine mesure la perte des micromères. En effet, si ceux-ci sont éliminés juste après leur formation, les cellules les plus végétatives restantes adoptent les propriétés des micromères : elles forment un centre organisateur et donnent naissance à des cellules produisant les spicules. Une larve normale pourra se former.





6.13 La région végétative de l'embryon d'oursin est caractérisée par une accumulation nucléaire de β-caténine

Dans l'embryon d'oursin, les blastomères précoces accumulent de la protéine β -caténine maternelle dans leur noyau suite à l'activation d'une partie de la voie de signalisation Wnt canonique (Encart 4B). Cette accumulation n'est néanmoins pas uniforme : la concentration de β -caténine est très élevée dans les noyaux des micromères et quasi nulle dans les noyaux des cellules animales du futur ectoderme. Cette différence est due, au moins partiellement, à l'activation, dans la région végétative, de protéines Dishevelled d'origine maternelle. Dishevelled est un activateur intracellulaire de la voie conduisant à la stabilisation et à l'importation nucléaire de la β -caténine. Cette dernière agit dans le noyau comme un co-activateur du facteur de transcription TCF et active la transcription de gènes zygotiques spécifiant l'identité végétative des cellules.

Des traitements qui inhibent la dégradation de la β -caténine, comme le chlorure de lithium (Section 4.2), conduisent à la formation d'embryons avec un ectoderme réduit et un tube digestif élargi. L'effet principal du chlorure de lithium est d'étendre vers la région animale la zone dans laquelle la β -caténine s'accumule dans le noyau, ce qui conduit à un déplacement vers le pôle animal de la frontière entre endoderme et ectoderme. Une surproduction de β -caténine aura le même effet et pourra même induire la formation d'endoderme dans des régions animales. À l'inverse, quand on empêche l'accumulation de β -caténine nucléaire dans les blastomères végétatifs, on inhibe complètement le développement de l'endoderme et du mésoderme. Des micromères dépourvus de β -caténine sont ainsi incapables d'induire la formation d'endoderme lorsqu'ils sont greffés dans la région animale de l'embryon.

La β -caténine maternelle et le facteur de transcription Otx activent la transcription du gène *pmar1* dans les micromères lors du quatrième cycle de division. Ce gène code un facteur de transcription produit uniquement dans les micromères



Illustration d'après Oliveri, P., Davidson, E.H. : Gene regulatory network controlling embryonic specification in the sea urchin. Curr. Opin. Genet. Dev. 2004, **14** : 351-360.



pendant la segmentation et dans la blastula précoce. Il est requis pour que les micromères puissent exercer leur rôle de centre organisateur et donner naissance au mésenchyme primaire à l'origine du squelette de la larve. La Fig. 6.24 résume les grandes étapes de la spécification de l'endomésoderme. Peu de temps après leur formation, les micromères produisent un signal appelé ES (pour *Early Signal*), qui induit l'identité endomésodermique dans les cellules Veg2. La protéine de signa-lisation Delta, produite après le septième cycle de division par les micromères, se fixe sur son récepteur Notch présent à la surface des cellules Veg2 adjacentes et induit celles-ci à adopter une identité mésodermique (mésenchyme secondaire et cellules pigmentaires). Plus tard cette même voie de signalisation interviendra dans la spécification de l'endoderme et l'établissement de la frontière entre endoderme et ectoderme.

La protéine de signalisation sécrétée Wnt-8, initialement produite par les micromères après le quatrième cycle de division, agit en retour sur ces cellules pour maintenir la stabilisation de la β -caténine et la fonction des micromères. Plus tard, la protéine Wnt-8 produite par les cellules endodermiques Veg2 induira une identité endodermique dans les cellules Veg1 adjacentes. En résumé, le mésoderme et l'endoderme de l'oursin sont spécifiés grâce à une série de signalisations à courte distance qui conduisent à des modifications de l'expression de certains gènes.

6.14 Les axes animal-végétatif et oral-aboral de l'oursin correspondent aux axes antéro-postérieur et dorso-ventral des autres deutérostomiens

En raison de sa forme, la larve pluteus d'oursin n'a pas d'axe antéro-postérieur ou dorso-ventral évident, contrairement aux embryons de vertébrés. Sur la base de la localisation de certaines molécules de signalisation conservées (BMP, Wnt, Nodal), on peut néanmoins constater que l'organisation de la blastula d'oursin présente des similitudes frappantes avec celle des blastulas des autres deutérostomiens.

Comme cela a été vu précédemment, l'embryon d'oursin s'organise autour de deux axes perpendiculaires, les axes animal-végétatif et oral-aboral. L'analyse de



Fig. 6.25 Correspondance possible entre les axes animalvégétatif et oral-aboral des embryons d'oursin avec les axes antéro-postérieur et dorso-ventral des embryons des amphibiens. À gauche : une vague de signalisation Wnt/ β -caténine, initialement végétative, s'étend au reste de l'embryon. L'endomésoderme (en bleu) et le neuroectoderme (en rouge) sont spécifiés. L'axe antéro-postérieur est défini comme se superposant à l'axe animal-végétatif. Au centre : un axe dorso-ventral perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur est défini par l'expression du gène *Nodal* sur une face de l'embryon. L'activité de la voie Nodal conduit à la production de BMP2/4 et de régulateurs positifs (flèches rouges) et négatifs (barres bleues) des voies Nodal et BMP2/4. Une blastula avec deux axes perpendiculaires est ainsi constituée. À droite : une série d'événements morphogénétiques conduit à la déformation de ces axes et à la mise en place de la morphologie finale de la larve pluteus.

D'après Angerer, L.M. et al. : **The evolution of nervous system patterning : insights from sea urchin development.** Development 2011, **138 :** 3613-3623.

la distribution de certaines molécules de signalisation et la comparaison avec les embryons d'amphibiens et de poissons, suggère une correspondance entre d'une part, axe oral-aboral et axe dorso-ventral, et d'autre part, axe animal-végétatif et axe anté-ro-postérieur (Fig. 6.25).

La région orale de l'embryon d'oursin exprime des gènes des familles Nodal, BMP et Chordin, qui sont exprimés le long de l'axe dorso-ventral dans les embryons de vertébrés. Des analyses fonctionnelles ont montré que la voie de signalisation Nodal est active uniquement dans la partie orale, alors que l'activité de la voie BMP est limitée à la partie aborale. Ceci suggère une correspondance entre l'axe oral-aboral de l'oursin et l'axe dorso-ventral des vertébrés.

Comme cela a été décrit dans la section 6.13, on retrouve une localisation nucléaire de la β -caténine, due à l'activation de la voie Wnt dans la partie végétative de l'embryon d'oursin, région où débutera la gastrulation. Chez le xénope, bien que la localisation nucléaire de la β -caténine soit dans, la région dorsale de l'embryon, elle correspond aussi au lieu de formation du blastopore (futur anus) et donc, comme pour les autres deutérosomiens, à la partie postérieure de l'embryon. Par comparaison, on peut donc supposer que chez l'oursin, la zone où la β -caténine s'accumule dans le noyau correspond à la région postérieure de l'embryon et, par extension, qu'il y a une correspondance entre axe animal-végétatif et axe antéro-postérieur.

Malgré les différences morphologiques évidentes entre les embryons d'oursins et de vertébrés, les premiers étant dépourvus, à proprement parler, de structures ventrales et dorsales, on retrouve néanmoins des similitudes importantes dans les mécanismes moléculaires qui contrôlent la mise en place de l'organisation de ces embryons.

6.15 Le squelette de la larve pluteus se forme à partir du mésenchyme primaire

La larve pluteus possède un squelette interne constitué de spicules composés de sels de calcium et de magnésium déposés sur une matrice protéique faite de glycoprotéines acides. Ces spicules sont sécrétés par les cellules mésenchymateuses



Fig. 6.26 Réseau de régulation génétique contrôlant la formation du squelette à partir des micromères. La localisation nucléaire et l'activité de la β-caténine dans les cellules les plus végétatives de l'embryon précoce (Fig. 6.25) conduit à la production dans ces cellules de Pmar1 qui réprime l'expression du gène hesC. Ceci conduit à l'expression dans les micromères d'une série de gènes, non exprimés dans les autres cellules à cause de la répression par HesC, qui contrôlent la production de protéines qui permettront aux cellules d'élaborer un squelette et d'acquérir leur identité spécifique. Cette identité se manifeste notamment par la capacité à émettre certains signaux, notamment la protéine Delta et le signal PMC (pour Primary Mesenchyme Cell), qui influencent le devenir des cellules adjacentes. L'effet de l'activité de la β-caténine est renforcé dans certaines cellules par l'activité de la voie MAPK. Il faut noter que la protéine Snail, qui est un répresseur transcriptionnel, stimule l'immigration des cellules mésodermiques.

D'après Ettensohn, C.A. et al. : Gene regulatory networks and developmental plasticity in the early sea urchin embryo : alternative deployment of the skeletogenic gene regulatory network. Development 2007, 134 : 3077-3087. primaires qui dérivent des micromères. On connaît assez bien le réseau de régulation génétique qui contrôle le développement des cellules squelettiques, depuis les événements se déroulant dans la blastula précoce jusqu'à l'activation de la transcription des gènes codant les protéines matricielles des spicules. Les gènes de ce réseau et leurs interactions ont été identifiés *via* l'étude de leur expression et de leur fonction grâce à l'utilisation de morpholinos (Encart 6B). Un réseau génétique complexe a été identifié pour le contrôle des spécifications embryonnaires (Encart 6D), mais ici ne seront évoqués que les gènes nécessaires à la formation des spicules.

Comme il a été décrit dans la Section 6.13, le gène zygotique pmar1 est exprimé uniquement dans les micromères et cette expression est requise pour que les micromères puissent former le mésenchyme à l'origine du squelette (Fig. 6.26). Si on induit la présence d'ARNm de *pmar1* dans toutes les cellules de l'embryon, elles deviendront toutes des cellules mésenchymateuses du type cité. Le gène pmar1 code un facteur de transcription qui réprime la transcription du gène hesC, luimême codant aussi un répresseur transcriptionnel HesC qui inhibe la transcription des gènes requis pour le développement du mésenchyme primaire. Ces gènes, par exemple alx1, ets1/2 et tbr, sont spécifiquement exprimés dans les micromères car dans ces cellules la présence de Pmar1 empêche la production de HesC (Fig. 6.26). C'est un exemple d'une stratégie courante dans le développement où beaucoup de cellules ont une certaine potentialité qui est réprimée dans la plupart d'entre elles (ici par HesC) et qui ne s'exprime que dans quelques cellules (ici le mésenchyme primaire) suite à la réception par celles-ci de signaux appropriés (ici l'activation de l'expression de *pmar1* par la β -caténine). Les gènes *alx1* et *ets1/2* codent des facteurs de transcription qui activent l'expression de gènes codant des protéines matricielles requises pour la minéralisation du squelette, ainsi que des protéines de signalisation, par exemple Delta, qui permet une différenciation coordonnée des cellules. D'autres voies de signalisation interviennent également, telle la voie MAPK qui est nécessaire, en conjonction avec Pmar1, pour l'expression des gènes ets1/2 (Fig. 6.26).

Le réseau génétique qui contrôle la formation du tissu mésodermique à l'origine du squelette est une petite partie d'un réseau beaucoup plus complexe dirigeant le développement du mésoderme et de l'endoderme (Encart 6D). La complexité de ce réseau n'est pas très étonnante quand on pense à quel point les régions régulatrices des gènes du développement peuvent elles-mêmes être complexes. Comme cela est évoqué dans le Chapitre 2, la région régulatrice du gène *even-skipped* chez la drosophile contient une multitude de sites de fixation pour des facteurs de transcription activateurs et inhibiteurs (Fig. 2.37). Ces sites se regroupent en modules régulateurs, chacun d'entre eux contrôlant l'expression du gène dans une région particulière de l'embryon. De nombreux gènes du développement de l'oursin ont ce même type d'organisation permettant leur expression à des temps différents et dans des régions distinctes de l'embryon.

Le gène Endo-16, qui code une glycoprotéine de fonction inconnue, en est un bon exemple. Ce gène est initialement exprimé dans les cellules de l'endoderme présomptif, dans la région végétative de la blastula (Fig. 6.27). Après la gastrulation, l'expression du gène Endo-16 devient plus forte et se restreint à la partie médiane du tube digestif, l'intestin moyen. La région régulatrice qui contrôle la transcription du gène est constituée d'environ 2 200 paires de bases et contient au moins 30 sites de fixation pour 13 facteurs de transcription différents. Cette région régulatrice peut être divisée en plusieurs sous-régions ou modules régulateurs, dont les fonctions ont été déterminées en attachant à chacun d'eux un gène rapporteur et en injectant les constructions d'ADN recombiné ainsi obtenues dans des œufs d'oursins. Dans ces expériences, on peut observer, par exemple, que le module A permet l'expression du gène rapporteur dans l'endoderme présomptif, alors que les modules D et C empêchent son expression dans le mésenchyme primaire. L'expression dans l'intestin moyen est sous le contrôle du module B. Les modules D, C, E et F sont activés lorsqu'on traite les embryons avec du chlorure de lithium, indiquant une régulation de l'expression du gène *Endo-16* par la β -caténine dans la blastula *via* ces modules régulateurs.



L'organisation modulaire de la région régulatrice du gène *Endo-16* est similaire à celle des gènes pair-rule chez la drosophile. Cet exemple chez l'oursin illustre une fois de plus l'importance des régions régulatrices des gènes dans l'intégration et l'interprétation des signaux impliqués dans le développement.

6.16 L'axe oral-aboral de l'embryon d'oursin est relié au plan de la première division de segmentation

L'axe oral-aboral est l'axe principal de la larve pluteus et définit avec l'axe animal-végétatif son plan de symétrie bilatérale. L'ectoderme oral donne naissance aux cellules du stomodeum (bouche), à l'épithélium de revêtement de la région orale et à des structures neurales. L'ectoderme aboral ne produit que l'épithélium qui recouvrira la majeure partie du corps de la larve. Il existe aussi des différences nettes d'organisation du squelette entre les régions orale et aborale : on peut reconnaître la face orale de la larve bien avant la formation de la bouche car les cellules mésenchymateuses à l'origine du squelette migrent pour former deux colonnes de cellules au niveau de la face orale de la larve. La migration de ces cellules est étudiée dans le Chapitre 9.

Contrairement à l'axe animal-végétatif, l'axe oral-aboral ne peut pas être identifié dans l'œuf fécondé et est potentiellement labile jusqu'au stade 16 cellules. C'est la raison pour laquelle Driesch a pu obtenir une larve complète et normale à partir d'un seul blastomère isolé au stade 2 cellules (Fig. 1.8). L'axe oral-aboral peut néanmoins être prédit en fonction du plan de la première division de l'œuf. Chez S. purpuratus, vu à partir du pôle animal, le futur axe se positionne à 45° dans le sens des aiguilles d'une montre par rapport au plan de la première division (Fig. 6.28). Chez d'autres espèces d'oursins, d'autres positionnements sont observés : l'axe oral-aboral peut coïncider avec le plan du premier clivage ou lui être perpendiculaire selon les cas. La première indication claire de l'établissement de l'axe oral-aboral est l'expression du gène *Nodal*, qui code une protéine de signalisation de la famille TGF- β , exclusivement dans les cellules de l'ectoderme oral de la blastula aux alentours des stades 60 à 120 cellules (Fig. 6.25). L'établissement du domaine d'expression de Nodal et de l'axe oral-aboral pourrait être lié à un gradient mitochondrial, la quantité de mitochondries étant plus élevée dans la future région orale. Ce gradient mitochondrial produit un gradient intracellulaire de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de dérivés réactifs de l'oxygène. La destruction expérimentale de H,O, dans l'embryon au stade 2 cellules supprime l'expression initiale de Nodal et conduit à la réduction de la région orale de la larve au profit de la région aborale. Ce processus aurait pour intermédiaire la kinase p38 activée par le stress dont la production est positivement régulée par H₂O₂.

Fig. 6.27 Organisation modulaire de

la région régulatrice du gène Endo-16. Les différentes sous-régions (modules de régulation) sont indiquées de A à G. Les domaines spatiaux de l'embryon dans lesquels ces modules de régulation sont actifs sont également indiqués. Treize facteurs de transcription se lient à plus de 50 sites individuels de fixation dans ces différents modules. Au cours du développement précoce, le gène Endo-16 est transcrit dans les cellules de la plaque végétative et de l'endoderme (futur tube digestif). Plus tard dans le développement, la transcription du gène se restreint aux cellules de l'intestin moyen.



Fig. 6.28 Positionnement de l'axe oral-aboral de l'embryon d'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* par rapport au premier plan de clivage. Vu du pôle animal, l'axe oral-aboral se positionne à 45° (dans le sens des aiguilles d'une montre) par rapport au plan de la première division de l'œuf. Il faut noter qu'à ce stade la polarité de l'axe n'est pas définie, seules les positions des deux extrémités de l'axe le sont.

6.17 L'ectoderme oral agit comme un centre organisateur

Nodal est un des premiers gènes zygotiques à être exprimé dans l'embryon d'oursin et la signalisation Nodal est utilisée pour organiser l'axe oral-aboral (Fig. 6.25). En effet, si l'activité de *Nodal* est inhibée, l'embryon conserve une symétrie radiaire et la différenciation de l'ectoderme en ectoderme oral ou aboral est bloquée. La surexpression de Nodal abolit également l'établissement de l'axe oral-aboral, mais dans ce cas tout l'ectoderme est converti en ectoderme oral. Si on empêche l'expression de *Nodal* jusqu'au stade 8 cellules et qu'elle s'exprime ensuite dans un seul blastomère (et sa descendance), même si celui-ci n'exprime pas normalement le gène, on obtient fréquemment un développement normal. Dans ce cas, les blastulas ainsi traitées développent un axe oral-aboral, et les cellules exprimant *Nodal* forment l'ectoderme oral, permettant ainsi à une larve pluteus normale de se former.

Ces expériences suggèrent que la signalisation Nodal contrôle l'établissement de l'axe oral-aboral. Le haut niveau de signalisation Nodal dans l'ectoderme oral conduit à l'expression des gènes goosecoïd, qui code un facteur de transcription (goosecoïd chez les amphibiens est exprimé dans les cellules du centre de Spemann), et bmp-2/4, qui code une protéine de signalisation sécrétée. Goosecoïd semble inhiber un devenir aboral pour les cellules de l'ectoderme oral, alors que BMP-2/4, qui diffuse depuis l'ectoderme oral, induit un devenir aboral dans le reste de l'ectoderme. La signalisation Nodal active également dans l'ectoderme oral la production de Lefty (une autre protéine de la famille TGF- β), un antagoniste de Nodal qui limite l'activité de Nodal à l'ectoderme oral. Si la fonction de Lefty est bloquée, la quasi-totalité de l'ectoderme devient de type oral. Chez l'oursin est ainsi retrouvé un circuit génétique similaire à celui impliqué dans la formation du mésoderme chez les vertébrés, mais utilisé à des fins différentes. Si la signalisation Nodal décrite chez l'oursin semble associée à l'axe dorso-ventral des deutérostomiens, en revanche elle ne semble pas impliquée dans la formation du mésoderme, alors que c'est un de ses rôles principaux chez les vertébrés (Chapitre 4). Cela illustre le fait qu'un même circuit génétique peut avoir des fonctions très différentes d'une espèce à l'autre.

Pour avoir un développement correct, l'établissement des deux axes doit se faire de manière coordonnée tant spatialement que temporellement. Chez l'oursin, le lien entre axes oral-aboral et animal-végétatif se fait *via* un effet indirect de la localisation nucléaire de la β -caténine dans la région végétative (Section 6.13). Dans la blastula précoce, le facteur de transcription FoxQ2 est initialement produit dans toutes les cellules de l'hémisphère animal et inhibe dans celles-ci l'expression de *Nodal*. La localisation nucléaire de la β -caténine, trouvée initialement dans la région la plus végétative de l'embryon, s'étend dans l'hémisphère animal, et est à l'origine de signaux qui restreignent l'expression de FoxQ2 à une petite zone près du pôle animal, la plaque animale (qui produira des cellules du système nerveux). La disparition de la protéine FoxQ2 du reste de la blastula permet l'expression de *Nodal* dans l'ectoderme oral présomptif (Fig. 6.25).

La signalisation Nodal a un second rôle important chez l'oursin, lors de l'établissement de l'asymétrie gauche-droite de la larve. Celle-ci possède en effet une structure interne impaire située à gauche et à partir de laquelle tous les tissus adultes seront formés. Cette asymétrie est contrôlée par le même circuit génétique (comprenant *Nodal*, *Lefty et Pitx2*) qui contrôle l'asymétrie gauche-droite chez les vertébrés (Section 5.16), mais l'expression des gènes du circuit est inversée chez l'oursin par rapport aux vertébrés. La signalisation Nodal est ainsi active dans l'ectoderme du côté droit de la larve et y inhibe la formation de la structure à l'origine des tissus adultes.

ENCART 6D Le réseau de régulation génétique contrôlant la spécification de l'endomésoderme chez l'oursin



Figure 1



La complexité des interactions entre les gènes régulant le développement peut être représentée sous forme d'un « schéma de cablage » dans lequel sont indiqués les gènes codant des facteurs de transcription et tous les gènes dont l'expression est régulée par ces facteurs de transcription. Un des premiers réseaux à avoir été établi de manière détaillée est celui qui contrôle le développement de l'endomésoderme chez l'oursin (Figure 1). La partie du réseau sur fond grisé en haut du schéma correspond à la localisation de la β -caténine sous le contrôle de facteurs maternels. Le reste du réseau correspond à des gènes à expression zygotique. PMC, mésenchyme primaire (micromères); Mes, mésenchyme secondaire; Veg1 Endo, endoderme dérivé de Veg1; Endo, reste de l'endoderme. Ce réseau est régulièrement vérifié et mis à jour Les interactions entre gènes du réseau ont été établies en combinant des approches informatiques et expérimentales, notamment l'inhibition systématique de la fonction des gènes concernés. Des réseaux de régulation génétique similaires sont maintenant également établis pour d'autres espèces modèles, notamment en utilisant des techniques comme l'immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage de l'ADN (ChIP-seq) qui permet d'identifier les régions du génome où se fixent des facteurs de transcription spécifiques (Fig. 3.41).

RÉSUMÉ

Les embryons d'oursin ont un remarquable pouvoir de régulation malgré le fait que le lignage cellulaire précoce soit invariable. Un axe animal-végétatif stable est établi dans l'ovule avant la fécondation grâce à la localisation de facteurs cytoplasmiques maternels. Après fécondation, les facteurs maternels contrôlent la formation d'un centre organisateur dans la région la plus végétative de l'embryon où se forment les micromères. Cet organisateur, comme le centre de Spemann chez les amphibiens, a la potentialité d'induire la formation d'une larve quasi complète. L'activation localisée de la voie Wht et l'accumulation dans le noyau de β -caténine définissent la région végétative et déterminent l'activité organisatrice des micromères. L'axe oral-aboral est établi après la fécondation. Des signaux émanant des micromères induisent la formation de l'endomésoderme et déterminent les identités différentielles des cellules endomésodermiques le long de l'axe animal-végétatif. L'axe oral-aboral s'établit grâce à l'activité de la voie de signalisation Nodal dans la future région orale de l'embryon. Le lieu et la chronologie d'expression des gènes du développement sont contrôlés par des réseaux de régulation génétique complexes dont certains commencent à être connus avec une certaine précision.



Résumé du Chapitre 6

- Chez de nombreux non vertébrés, tel le nématode, des localisations cytoplasmiques et le lignage cellulaire, combinés à des interactions cellulaires locales, semblent être très importants pour le développement.
- Chez ces animaux, il ne semble pas y avoir de régions signalisatrices correspondant au centre organisateur des vertébrés, ni de gradients morphogènes similaires à ceux de la drosophile.
- Ceci reflète sans doute la prédominance de mécanismes qui spécifient l'identité cellulaire cellule par cellule, et non pas au niveau de groupes de cellules comme c'est le cas chez la drosophile et les vertébrés.
- Même si des arguments génétiques, du type de ceux obtenus chez la drosophile, ne sont généralement pas disponibles, sauf chez *C. elegans*, il semble néanmoins clair que des facteurs maternels contrôlent le développement précoce chez de très nombreux animaux.
- Chez de nombreuses espèces, l'établissement des axes de l'embryon est lié à l'orientation du premier plan de clivage du zygote, qui est elle-même déterminée par des facteurs maternels.
- Des divisions asymétriques permettant des distributions inégales de déterminants cytoplasmiques entre les cellules filles sont très importantes pour le développement précoce de l'embryon.
- Des mouvements de cytoplasme impliqués dans la localisation de déterminants ont souvent lieu après la fécondation. Ce type de mouvements se retrouve aussi chez les amphibiens lors de la rotation corticale.
- Chez toutes les espèces évoquées dans ce chapitre, se produisent des interactions cellulaires, même à des stades précoces du développement. La spécification de l'asymétrie gauche-droite chez les nématodes en est un exemple, une petite modification des relations entre cellules pouvant inverser la latéralité.
- Dans la plupart des cas, il s'agit d'interactions locales impliquant un petit nombre de cellules adjacentes. Chez les vertébrés, en revanche, ces interactions vont s'étendre sur de plus grandes distances et vont généralement concerner des groupes de cellules.
- L'embryon de l'oursin présente en revanche un fort pouvoir de régulation et les interactions cellulaires jouent un rôle clé dans le développement, ce qui est similaire à ce que l'on observe chez les vertébrés.
- Les micromères au pôle végétatif de l'embryon d'oursin ont des propriétés similaires à celles du centre organisateur des vertébrés, et l'identité cellulaire est spécifiée au niveau de groupes de cellules et non cellules par cellules.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Qu'entend-on par division cellulaire asymétrique : y a-t-il forcément une des cellules filles plus grande que l'autre ? Quelle autre possibilité fait qu'une division cellulaire est qualifiée d'asymétrique ? Comment les deux types de divisions asymétriques sont-ils illustrés par la première division du zygote de *Caenorhabditis elegans ?*

2. Comparer et mettre en évidence les différences entre inhibition de l'expression génique par RNAi et par des miARN. Incorporer les éléments suivants dans votre réponse : *versus* naturel ; environ 22 nucléotides ; RISC ; dégradation *versus* traduction.

3. Comment l'axe antéro-postérieur de *C. elegans* est-il défini ? Quel est le rôle des protéines PAR dans la détermination de cet axe ?

4. Lors de l'étude du lignage cellulaire de *C. elegans*, une convention a été établie qui permet de nommer de manière non ambigüe chacune des 558 cellules présentes au moment de l'éclosion. Un élément clé de ce système est de désigner la cellule-fille antérieure de chacune des divisions cellulaires par un "a" et la cellule-fille postérieure par un "p". Se référer à la Fig. 6.10 et expliquer pourquoi la cellule du pharynx indiquée est appelée « MS paapaaa » et pourquoi la cellule apoptotique est appelée « MS paapa ».

5. À quelle classe de protéines de signalisation les protéines GLP-1 et APX-1 de *C. elegans* appartiennent-elles ? Quel est le rôle du système GLP-1/APX-1 dans la définition de l'axe dorso-ventral ? « APX » est l'abréviation de *anterior pharynx in excess* (pharynx antérieur en excès) – pourquoi ce nom a-t-il été donné au gène en question ? (Se référer à la Section 6.4 et à la Fig. 6.9 pour répondre à cette question).

6. Que sont les gènes hétérochroniques ? Quelle caractéristique du développement de *C. elegans* fait que cet organisme est particulièrement adapté pour identifier de tels gènes ?

7. Le miARN *lin-4* réprime la traduction de l'ARNm *lin-14*. Vu que Lin-14 maintient la cellule Tap dans un état de premier stade larvaire (L1), cette répression est requise pour la transition vers une identité L2. Sachant cela, quel est le phénotype du mutant perte de fonction de *lin-14* ? Quel est le phénotype d'un ver porteur des mutations perte de fonction pour ces deux gènes ? Expliquer votre réponse.

8. La cellule ancre chez *C. elegans* est nécessaire à l'induction du développement de la vulve. Pour caractériser cette induction, indiquer quelles cellules produisent les protéines EGF, EGFR (récepteur à l'EGF), Delta et Notch. Préciser le rôle de ces protéines dans l'induction de la vulve.

9. Quelles sont les similitudes entre la gastrulation chez *Strongylocentrotus* et chez *Xenopus*, qui permettent de dire que ces deux espèces sont des deutérostomiens ?

10. Comparer les deux premiers cycles de clivage chez l'oursin et le xénope. Quelles sont les différences et/ou similitudes au point de vue morphologique ? Les événements de détermination qui ont lieu au stade 4 cellules chez le xénope se déroulent-ils également chez l'oursin ? Décrire les différences en terme de régulation embryonnaire.

11. Les micromères de l'oursin forment un centre organisateur. Décrire deux expériences qui supportent cette affirmation (voir Fig. 6.23).

12. La larve de l'oursin a deux axes apparents, l'axe animal-végétatif et l'axe oral-aboral, ainsi qu'une asymétrie gauche-droite interne. Comparer les bases moléculaires de l'établissement de ces trois axes avec les axes correspondants chez les amphibiens, par exemple sous forme d'un tableau avec six lignes (les 6 types d'axes) et une colonne pour chaque molécule impliquée (facteurs de transcription et protéines de signalisation).

QCM

- **NB**. Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.
- **1.** *C. elegans* est particulièrement connu pour
- a) sa formation d'un centre organisateur analogue à celui du xénope
- b) son lignage cellulaire complètement déterminé au cours du développement
- c) la grande taille et la facilité de manipulation de ses blastomères
- d) ses mécanismes de métamorphose
- 2. Les granules P des nématodes sont
- a) des déterminants de l'axe antéro-postérieur
- b) des déterminants de la lignée germinale
- c) des précurseurs de protéines de signalisation de la famille du $\mbox{TGF-}\beta$
- d) des restes du pronucléus spermatique

3. Chez les mouches, les grenouilles et les poulets, des gradients de morphogènes définissent les futurs axes antéro-postérieur et dorso-ventral de l'embryon en développement. Comment l'axe antéro-postérieur est-il déterminé chez *C. elegans* ?

- a) la protéine Bicoïd est produite dans la région antérieure de l'œuf fécondé entraînant l'existence d'un gradient qui détermine l'axe antéro-postérieur.
- b) des gradients opposés de chordin et de BMP-4 établissent l'axe antéro-postérieur.
- c) l'entrée du spermatozoïde provoque une réorganisation du cytosquelette et à une redistribution de protéines PAR maternelles, qui en retour contrôlent l'établissement de l'axe antéro-postérieur.
- d) La β -caténine se localise dans le noyau des futures cellules antérieures après la fécondation.
- 4. Que sont les gènes lin-4 et lin-14 de C. elegans ?
- a) lin-4 et lin-14 sont des gènes Hox.
- b) *lin-4* et *lin-14* sont des gènes qui contrôlent la première division du zygote et donc le lignage des cellules AB et P1.
- c) *lin-4* contrôle le moment de la transcription de *lin-14*, et est ainsi qualifié de gène « hétérochronique ».
- d) Un miARN produit à partir de *lin-4*, réprime la traduction de *lin-14*, qui en retour régule la chronologie du développement larvaire.
- 5. Chez C. elegans, le seul gène Hox actif durant l'embryogenèse est
- a) *ceh-13*, l'orthologue chez *C. elegans* du gène labial de la drosophile
- b) *egl-5*, l'orthologue chez *C. elegans* du gène *Abd-B* et des gènes Hox9-13 des vertébrés
- c) *lin-39*, un gène *de C. elegans* apparenté à *Deformed* et à *Sex combs reduced* de la drosophile
- d) *mab-*5, un gène *de C. elegans* apparenté aux gènes *Antennapedia, Ultrabithorax* et *abdominal-A* de la drosophile
- **6.** Parmi les organismes suivants, lesquels sont les plus proches d'un point de vue phylogénétique de l'espèce humaine ?
- a) Les insectes telle la drosophile, en raison de leur système nerveux sophistiqué et la présence de pattes.
- b) Les plantes, car leur divergence précoce des lignées animales signifie qu'elles sont étroitement apparentées aux animaux, et spécialement à l'espèce humaine.
- c) Les échinodermes tel l'oursin, malgré leur symétrie radiaire et l'absence de membres.
- d) Les nématodes tel *C. elegans* malgré leur peu de cellules, leurs génomes réduits, et le nombre restreint de gènes Hox.

7. Laquelle des affirmations suivantes concernant le pouvoir de régulation de l'embryon d'oursin est-elle vraie ?

- a) Chaque blastomère au stade 8 cellules peut produire une larve complète, ce qui n'est plus le cas au stade 60 cellules où chaque blastomère ne pourra plus produire que certains tissus bien définis.
- b) Chaque blastomère au stade 4 cellules possède une partie de l'axe initial animal-végétatif, et cultivé isolément peut produire une larve complète quoique plus petite que la normale.
- c) Les blastomères au pôle animal ou végétatif cultivés isolément peuvent produire un embryon complet, pour autant qu'un des deux pôles (animal ou végétatif) soit inclus.
- d) Jusqu'au moment de l'éclosion de la larve pluteus, chaque blastomère peut être cultivé isolément et être capable de produire une larve d'organisation et de taille normale.

8. En quel sens le centre organisateur de l'embryon d'oursin est-il similaire à celui des embryons d'amphibiens ?

- a) Les cellules du centre organisateur accumulent de la β-caténine qui active la production de molécules de signalisation intercellulaire.
- b) Le centre organisateur se forme à proximité de la lèvre dorsale du blastopore.
- c) Le centre organisateur induit la formation de l'axe dorso-ventral.
- d) Les cellules du centre organisateur produisent de grande quantité de Nodal.
- 9. Chez l'embryon d'oursin, la fonction de Nodal et BMP est
- a) d'établir l'axe antéro-postérieur
- b) de spécifier le mésoderme
- c) de contrôler le patron des divisions cellulaires précoces
- d) d'organiser l'axe dorso-ventral

10. Une vision classique en biologie du développement est de classer les embryons comme étant « mosaïque » ou « à régulation ». Laquelle des affirmations suivantes est-elle vraie ?

- a) *C. elegans* est un embryon mosaïque dont le développement fait néanmoins appel à des interactions entre les cellules, alors que les embryons d'oursin sont à régulation
- b) Les embryons de l'oursin et de *C. elegans* sont des embryons à régulation
- c) L'embryon de *C. elegans* est à régulation et celui de l'oursin un embryon mosaïque
- d) L'embryon de *C. elegans* est un embryon strictement mosaïque, alors que celui de l'oursin est un embryon à regulation

Réponses aux QCM

1 : b, 2 : b, 3 : c, 4 : d, 5 : a, 6 : c, 7 : b, 8 : a, 9 : d, 10 : a.

Références bibliographiques

Nématodes

- Sommer, R.J. : **Evolution of development in nematodes related to** *C. elegans* (December 14, 2005), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/ wormbook.1.46.1, http://www.wormbook.org (accessible le 15 janvier 2017).
- Sulston, J.E., Scherienberg, E., White, J.G., Thompson, J.N. : **The embryonic cell lineage of the nematode** *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol*. 1983, **100** : 64–119. A view of the complete lineage is available at http://www. wormatlas.org/celllineages.html (accessible le 15 janvier 2017)

6.1 Le lignage cellulaire de *Caenorhabditis elegans* est en grande partie invariant.

- Sulston, J. : Cell lineage. In *The Nematode* Caenorhabditis elegans. Edited by Wood, WB. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988: 123–156.
- Wood, W.B. : **Embryology**. In *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Edited by Wood, WB. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988: 215–242.

6.2 L'axe antéro-postérieur de *Caenorhabditis elegans* est déterminé par des divisions asymétriques

Cheeks, R.J., Canman, J.C., Gabriel, W.N., Meyer, N., Strome, S., Goldstein, B. : *C. elegans* PAR proteins function by mobilizing

and stabilizing asymmetrically localized protein complexes. *Curr. Biol* 2004, **14**: 851–862.

- Cowan, C.R., Hyman, A.A. : Acto-myosin reorganization and **PAR polarity in** *C. elegans.* Development 2007, **134** : 1035–1043.
- Goldstein, B., Macara, I.G. : **The PAR proteins : fundamental players in animal cell polarization**. *Dev. Cell* 2007, **13 :** 609–622.
- Munro, E., Nance, J., Priess, J.R. : Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell* 2004, **7** : 413–424.

ENCART 6A Les voies apoptotiques chez les nématodes, la drosophile et les mammifères

- Meier, P., Finch, A., Evan, G. : Apoptosis in development. *Nature* 2000, 407 : 796–801.
- Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C. : **Programmed cell death in animal development**. *Cell* 1997, **88 :** 347–354.

ENCART 6B Extinction génique par des ARN anti-sens et interférence à ARN

- Brennecke, J., Malone, C.D., Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Stark, A., Hannon, G.J. : **An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing**. *Science* 2008, **322** : 1387–1392.
- DasGupta, R., Nybakken, K., Booker, M., Mathey-Prevot, B., Gonsalves, F., Changkakoty, B., Perrimon, N. : A case study of the reproducibility of transcriptional reporter cell-based RNAi screens in *Drosophila*. *Genome Biol*. 2007, 8 : R203.
- Dykxhoorn, D.M., Novind, C.D., Sharp, P.A. : Killing the messenger : short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 2003, **4** : 457–467.
- Eisen, J.S., Smith, J.C. : Controlling morpholino experiments : don't stop making antisense. *Development* 2008, 135 : 1735–1743.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P., Ahringer, J. : Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 2003, 421 : 231–237.
- Nature Insight : **RNA interference**. *Nature* 2004, **431** : 337–370.
- Sonnichsen, B., *et al.* : Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2005, 434 : 462–469.

6.3 L'axe dorso-ventral est déterminé chez *Caenorhabditis elegans* par des interactions intercellulaires

- Bergmann, D.C., Lee, M., Robertson, B., Tsou, M.F., Rose, L.S., Wood, W.B. : **Embryonic handedness choice in** *C. elegans* **involves the Gα protein GPA-16**. *Development* 2003, **130** : 5731–5740.
- Wood, W.B. : Evidence from reversal of handedness in *C. elegans* embryos for early cell interactions determining cell fates. *Nature* 1991, **349 :** 536–538.

6.4 Des divisions asymétriques et des interactions entre les cellules spécifient les destinées cellulaires dans les embryons précoces de nematode

Eisenmann, D.M. : **Wnt signaling** (June 25, 2005), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/

wormbook.1.7.1, http://www.wormbook.org (date accessed 13 May 2010).

- Evans, T.C., Crittenden, S.L., Kodoyianni, V., Kimble, J. : Translational control of maternal *glp-1* mRNA establishes an asymmetry in the *C. elegans* embryo. *Cell* 1994, 77 : 183–194.
- Kidd, A.R.3rd, Miskowski, J.A., Siegfried, K.R., Sawa, H., Kimble, J. : A beta-catenin identified by functional rather than sequence criteria and its role in Wnt/MAPK signaling. *Cell* 2005, 121 : 761–772.

Lyczak, R., Gomes, J.E., Bowerman, B. : **Heads or tails : cell** polarity and axis formation in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev. Cell* 2002, **3 :** 157–166.

Mello, G.C., Draper, B.W., Priess, J.R. : The maternal genes *apx-1* and *glp-1* and the establishment of dorsal-ventral polarity in the early *C. elegans* embryo. *Cell* 1994, **77** : 95–106.

6.5 La différenciation cellulaire chez le nématode est étroitement liée au patron des divisions cellulaires

Goldstein, B., Macara, I.G. : **The PAR proteins : fundamental players in animal cell polarization.** *Dev Cell.* 2007, *13 :* 609–622.

Maduro, M.F. : Structure and evolution of the *C. elegans* embryonic endomesoderm network. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, **1789**: 250–260.

Mizumoto, K., Sawa, H. : Two β s or not two β s : regulation of asymmetric division by β -catenin. Trends Cell Biol. 2007, 17 : 465–473.

Mizumoto, K., Sawa, H. : **Cortical β-catenin and APC regulate asymmetric nuclear β-catenin localization during asymmetric cell division in** *C. elegans. Dev. Cell* 2007, **12** : 287–299.

Nance, J., Zallen, J.A. : Elaborating polarity : PAR proteins and the cytoskeleton. *Development* 2011, 138 : 799–809.

Park, F.D., Priess, J.R. : Establishment of POP-1 asymmetry in early *C. elegans* embryos. *Development* 2003, 130 : 3547–3556.

Park, F.D., Tenlen, J.R., Priess, J.R. : *C. elegans* MOM-5/frizzled functions in MOM-2/Wnt-independent cell polarity and is localized asymmetrically prior to cell division. *Curr. Biol.* 2004, 14 : 2252–2258.

Phillips, B.T., Kidd, A.R.IIIKing, R., Hardin, J., Kimble, J. : Reciprocal asymmetry of SYS-1/β-catenin and POP-1/TCF controls asymmetric divisions in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2007, 104 : 3231–3236.

6.6 Les gènes Hox spécifient les identités de position le long de l'axe antéro-postérieur chez *Caenorhabditis elegans*

Aboobaker, A.A., Blaxter, M.L. : Hox gene loss during dynamic evolution of the nematode cluster. *Curr. Biol.* 2003, 13: 37–40.

Clark, S.G, Chisholm, A.D., Horvitz, H.R. : **Control of cell fates in the central body region of** *C. elegans* **by the homeobox gene** *lin-39. Cell* 1993, **74** : 43–55.

Cowing, D., Kenyon, C. : Correct Hox gene expression established independently of position in *Caenorhabditis elegans. Nature* 1996, **382** : 353–356.

Salser, S.J., Kenyon, C. : A C. elegans Hox gene switches on, off, on and off again to regulate proliferation, differentiation and morphogenesis. Development 1996, 122 : 1651–1661.

Van Auken, K., Weaver, D.C., Edgar, L.G, Wood, W.B. : Caenorhabditis elegans embryonic axial patterning requires two recently discovered posterior-group Hox genes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2000, 97 : 4499–4503.

6.7 La chronologie des événements marquant le développement du nématode est sous un contrôle génétique qui implique des microARN

- Ambros, V. : Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans. Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000, **10** : 428–433.
- Austin, J., Kenyon, C. : **Developmental timekeeping : marking time with antisense**. *Curr. Biol.* 1994, **4 :** 366–396.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N, Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., Mello, C.C. : Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001, 106 : 23–34.

ENCART 6C Extinction génique par des microARN

- Bartel, D.P. : MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004, **116** : 281–297.
- He, L., Hannon, G.J. : MicroRNAs : small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev. Genet.* 2004, **5** : 522–531.
- Liu, J. : Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008, **20** : 214–221.
- Murchison, E.P., Hannon, G.J. : miRNAs on the move : miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004, **16** : 223–229.

6.8 Le développement de la vulve est initié par l'induction d'un petit nombre de cellules due à des signaux à courte portée émis par une cellule inductrice unique.

- Kenyon, C. : A perfect vulva every time : gradients and signaling cascades in *C. elegans. Cell* 1995, **82** : 171–174.
- Sharma-Kishore, R., White, J.G., Southgate, E., Podbilewicz, B. : **Formation of the vulva in** *Caenorhabditis* **elegans : a**
- paradigm for organogenesis. *Development* 1999, **126** : 691–699. Sundaram, M., Han, M. : **Control and integration of cell**
- signaling pathways during *C. elegans* vulval development. *BioEssays* 1996, **18 :** 473–480.

Yoo, A.S., Bais, C., Greenwald, I. : Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in *C. elegans* vulval development. *Science* 2004, 303 : 663–636.

Échinodermes

Horstadius, S. : *Experimental Embryology of Echinoderms*. Oxford : Clarendon Press, 1973.

6.9 Le développement embryonnaire de l'oursin donne naissance à une larve nageuse

- Angerer, L.M., Yaguchi, S., Angerer, R.C., Burke, R.D. : **The** evolution of nervous system patterning : insights from sea urchin development. *Development* 2011, **138** : 3613–3623.
- Raff, R.A., Raff, E.C. : **Tinkering : new embryos from old rapidly and cheaply**. *Novartis Found*. *Symp*. 2007, **284 :** 35–45; discussion 45–54, 110–115.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium : **The genome of the sea urchin** *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 2006, **314** : 941–952. Erratum in : *Science* 2007, **315** : 766.

Lien nécessitant une souscription - à supprimer

Wilt, F.H. : Determination and morphogenesis in the sea-urchin embryo. *Development* 1987, 100 : 559–576.

6.10 L'œuf de l'oursin est polarisé suivant l'axe animalvégétatif

Davidson, E.H., Cameron, R.S., Ransick, A. : Specification of cell fate in the sea-urchin embryo : summary and some proposed mechanisms. *Development* 1998, 125 : 3269–3290.

- Henry, J.J. : The development of dorsoventral and bilateral axial properties in sea-urchin embryos. Semin. Cell Dev. Biol. 1998, 9: 43–52.
- Logan, C.Y., McClay, D.R. : The allocation of early blastomeres to the ectoderm and endoderm is variable in the sea-urchin embryo. *Development* 1997, **124** : 2213–2223.

6.11 La carte des territoires présomptifs de l'oursin est finement spécifiée, mais l'embryon possède néanmoins un fort pouvoir de régulation embryonnaire

Angerer, L.M., Angerer, R.C. : Patterning the sea-urchin embryo : gene regulatory networks, signaling pathways, and cellular interactions. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2003, **53** : 159–198.

Angerer, L.M., Oleksyn, D.W., Logan, C.Y., McClay, D.R., Dale, L., Angerer, R.C. : A BMP pathway regulates cell fate allocation along the sea urchin animal-vegetal embryonic axis. Development 2000, 127 : 1105–1114.

- Sweet, H.C., Hodor, P.G., Ettensohn, C.A. : The role of micromere signaling in Notch activation and mesoderm specification during sea-urchin embryogenesis. *Development* 1999, 126 : 5255–5265.
- Wessel, G.M., Wikramanayake, A. : How to grow a gut : ontogeny of the endoderm in the sea-urchin embryo. *BioEssays* 1999, 21 : 459–471.

6.12 La région végétative de l'embryon d'oursin agit comme un centre organisateur

Ransick, A., Davidson, E.H. : A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea-urchin embryo. *Science* 1993, **259** : 1134–1138.

6.13 La région végétative de l'embryon d'oursin est caractérisée par une accumulation nucléaire de β-caténine

Ettensohn, C.A. : The emergence of pattern in embryogenesis : regulation of beta-catenin localization during early sea urchin development. *Sci STKE* 2006, **14** : pe48.

Weitzel, H.E., Illies, M.R., Byrum, C.A., Xu, R., Wikramanayake, A.H., Ettensohn, C.A. : Differential stability of beta-catenin along the animal-vegetal axis of the sea-urchin embryo mediated by dishevelled. *Development* 2004, 131 : 2947–2955.

6.14 Les axes animal-végétatif et oral-aboral de l'oursin correspondent aux axes antéro-postérieur et dorso-ventral des autres deutérostomiens

Angerer, L.M., Yaguchi, S., Angerer, R.C., Burke, R.D. : The evolution of nervous system patterning : insights from sea urchin development. *Development* 2011, **138** : 3613–3623.

Ettensohn, C.A., Kitazawa, C., Cheers, M.S., Leonard, J.D., Sharma, T. : Gene regulatory networks and developmental plasticity in the early sea urchin embryo : alternative deployment of the skeletogenic gene regulatory network. *Development* 2007, 134 : 3077–3087.

6.15 Le squelette de la larve pluteus se forme à partir du mésenchyme primaire

Ettensohn, C.A. : Lessons from a gene regulatory network : echinoderm skeletogenesis provides insights into evolution, plasticity and morphogenesis. *Development* 2009, **136** : 11–21.

Kirchnamer, C.V., Yuh, C.V., Davidson, E.H. : Modular cisregulatory organization of developmentally expressed genes : two genes transcribed territorially in the sea-urchin embryo, and additional examples. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1996, 93 : 9322–9328.

6.16 L'axe oral-aboral de l'embryon d'oursin est relié au plan de la première division de segmentation

Cameron, R.A., Fraser, S.E., Britten, R.J., Davidson, E.H. : **The** oral-aboral axis of a sea-urchin embryo is specified by first cleavage. *Development* 1989, **106** : 641–647.

6.17 L'ectoderme oral agit comme un centre organisateur

- Coffman, J.A., Coluccio, A., Planchart, A., Robertson, A.J. : Oralaboral axis specification in the sea-urchin embryo III. Role of mitochondrial redox signaling via H₂O₂. *Dev. Biol.* 2009, 330 : 123–130.
- Duboc, V., Lepage, T. : A conserved role for the nodal signaling pathway in the establishment of dorso-ventral and left-right axes in deuterostomes. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 2008, **310B**: 41–53.
- Duboc, V., Lapraz, F., Besnardeau, L., Lepage, T. : Lefty acts as an essential modulator of Nodal activity during sea urchin oral-aboral axis formation. *Dev. Biol.* 2008, **320** : 49–59.
- Duboc, V., Rottinger, E., Besnardeau, L., Lepage, T. : Nodal and BMP2/4 signaling organizes the oral-aboral axis of the seaurchin embryo. *Dev. Cell* 2004, 6 : 397–410.

Yaguchi, S., Yaguchi, J., Angerer, R.C., Angerer, L.M. : A Wnt-FoxQ2-nodal pathway links primary and secondary axis specification in sea-urchin embryos. *Dev. Cell* 2008, 14 : 97–107.

ENCART 6D Le réseau de régulation génétique contrôlant la spécification de l'endomésoderme chez l'oursin

- The Davidson Lab : Endomesoderm & Ectoderm Models http:// sugp.caltech.edu/endomes/ (consulté le 01/12/2016)
- Davidson, E.H. : A view from the genome : spatial control of transcription in sea urchin development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999, **9** : 530–541.
- Davidson, E.H. *et al.* : A genomic regulatory network for development. *Science* 2002, **295** : 1669–1678.
- Oliveri, P., Davidson, E.H. : Gene regulatory network controlling embryonic specification in the sea urchin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004, 14 : 351–360.
- Oliveri, P., Tu, Q., Davidson, E.H. : Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage. *Proc. Natl Acad. Sci.* USA 2008, **105 :** 5955–5962.

Développement des plantes

• Développement embryonnaire

Méristèmes

 Développement floral et contrôle de la floraison

Du fait de la rigidité des parois végétales et l'absence de déplacements cellulaires au sein des tissus, l'architecture d'une plante est construite essentiellement par l'organisation spatiale des divisions cellulaires. Malgré cet apparent manque de variabilité, le devenir des cellules au cours du développement est, comme chez les animaux, largement déterminé par une combinaison de signaux de positions et de communication intercellulaire. Si elles communiquent par des signaux extracellulaires et des interactions de surface, les cellules de plantes sont aussi connectées entre elles par des canaux cytoplasmiques permettant le transport de protéines comme les facteurs de transcription directement de cellules à cellules.

Le groupe des végétaux est vaste, incluant les algues, dont une partie est représentée par des organismes unicellulaires, comme les plantes terrestres quant à elles toutes pluricellulaires et présentant une immense variabilité de formes. Les végétaux et les animaux ont vraisemblablement acquis leurs processus de développement séparément au cours de l'évolution, leur dernier ancêtre commun étant un eucaryote unicellulaire daté de quelque 1,6 milliard d'année. Ainsi, la connaissance du développement des végétaux n'est pas seulement intéressante pour ses applications en agriculture mais aussi pour elle-même. Par comparaison avec les animaux, l'étude du développement des plantes peut éclairer les modalités de l'évolution, dans deux groupes d'organismes multicellulaires, des mécanismes du développement, indépendamment et sous l'influence de contraintes différentes de développement.

Plantes et animaux utilisent-ils les mêmes mécanismes au cours de leur développement ? Dans ce chapitre, il sera montré que les patrons d'expression des gènes impliqués dans le développement floral suivent la même logique que ceux des gènes Hox dans la mise en place de l'axe du corps des animaux bien que les gènes impliqués soient totalement différents. De telles similitudes entre les développements des plantes et des animaux découlent du fait que les modalités moléculaires de régulation génique sont les mêmes et qu'ainsi, des mécanismes comparables de configuration spatiale de l'expression génique au niveau tissulaire sont prévisibles. De nombreux mécanismes généraux de contrôle identifiés lors de l'étude du développement des animaux, comme les divisions cellulaires asymétriques, la réponse aux signaux de position, l'inhibition latérale ou les modifications des profils d'expression des gènes en réponse à des signaux extracellulaires, sont aussi présents chez les plantes. Les différences de contrôle du développement entre plantes et animaux proviennent de l'existence de voies de communication intercellulaire propres aux plantes, de la présence de parois cellulaires rigides et de l'absence de mouvements cellulaires de grande ampleur, et enfin de l'impact bien plus important de l'environnement sur leur développement.

Une différence majeure entre le développement des plantes et celui des animaux est que l'essentiel du développement se produit non pas dans l'embryon mais dans la plante en croissance. L'embryon de plante dans la graine n'est pas une version miniature de l'organisme qu'il va devenir : toutes les structures « adultes » de la plante, tiges, racines, feuilles et fleurs, sont produites après la germination à partir d'amas localisés de cellules indifférenciées appelés **méristèmes**. Deux méristèmes sont mis en place dans l'embryon : un à l'extrémité de la racine, l'autre à l'extrémité de la tige. Ils persistent chez la plante adulte et c'est à partir d'eux que se forme la quasi-totalité des autres méristèmes, comme ceux des feuilles en développement ou des tiges florifères. Au sein des méristèmes, les cellules peuvent se diviser de manière répétée et ont la potentialité de donner naissance à tous les tissus et organes de la plante. La structuration du méristème, permettant la production d'organes comme les feuilles ou les fleurs, est donc maintenue tout au long de la vie de la plante.

Les cellules animales et végétales ont de nombreux traits communs, notamment une même biochimie de base, mais certaines différences essentielles ont une incidence sur le développement végétal. L'une des plus importantes est la présence d'un cadre relativement rigide, la paroi cellulaire, autour des cellules végétales. En conséquence, il n'existe quasiment pas de migration cellulaire chez les plantes et les changements morphologiques au cours du développement ne proviennent pas de mouvements de feuillets cellulaires. La forme des structures est essentiellement générée par des différences de vitesse de divisions et d'orientations des plans de division cellulaire, amplifiés par une croissance cellulaire orientée. Contrairement aux cellules animales, une cellule végétale se divise sans l'étranglement dû à un anneau contractile d'actomyosine. La nouvelle paroi et les membranes plasmiques se forment *in situ*, à mi-chemin entre les deux pôles du fuseau mitotique. La mise en place transitoire d'une bande corticale de microtubules et de filaments d'actine à l'emplacement de la future division cellulaire indique que, chez les plantes, le plan de division semble être déterminé avant que la mitose ne commence.

Comme pour les animaux, la détermination des cellules est l'une des questions principales du développement des plantes. Beaucoup de structures chez les plantes se développent en impliquant des patrons stéréotypés de divisions cellulaires et cette observation souligne l'importance du lignage cellulaire. Mais le devenir des cellules est aussi dans de nombreux cas déterminé par d'autres facteurs comme la position dans le méristème ou une signalisation cellule-cellule. Bien qu'elle soit particulièrement fine dans certaines zones comme les méristèmes, la paroi peut sembler être une barrière au passage de molécules signal comme des protéines ; cependant, la plupart des molécules de signalisation extracellulaire végétales, comme l'éthylène, les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, les stéroïdes ou les peptides, sont de petites molécules capables de traverser les parois cellulaires. Les stéroïdes et les peptides possèdent des récepteurs transmembranaires de type protéine-kinase, qui sont très nombreux chez les plantes. Les récepteurs des autres molécules de signalisation sont principalement intracellulaires. Les cellules végétales communiquent aussi entre elles grâce à l'existence de fins canaux cytoplasmiques appelés plasmodesmes, qui mettent en communication le cytoplasme de cellules voisines. Par cette voie, certaines protéines impliquées dans la régulation génique, voire des ARNm, passent directement d'une cellule à l'autre. La taille de ces canaux est variable, les cellules des tiges ayant les diamètres des plasmodesmes les plus gros.

Une autre différence importante entre les plantes et les animaux réside dans le fait qu'une plante entière et fertile peut se développer à partir d'une cellule somatique différenciée et non pas seulement à partir d'un œuf fécondé. Cela suggère que, contrairement aux cellules différenciées d'animaux adultes, certaines cellules différenciées de la plante adulte restent **totipotentes**. Peut-être ces cellules ne sont-elles pas totalement déterminées, à l'inverse des cellules animales adultes ; peut-être sont-elles capables de sortir de cet état déterminé par des modalités actuellement inconnues. En tout cas, cette différence entre plantes et animaux souligne les risques d'une généralisation hâtive des concepts dérivés du développement des animaux au développement des plantes.

Une petite herbe ressemblant au cresson, *Arabidopsis thaliana*, est devenue la plante modèle pour les études génétiques et du développement, et elle fournira de





Fig. 7.1 Cycle de vie de l'arabette. Chez les plantes à fleurs, chaque oosphère est contenue dans un ovule et les ovules sont enfermés dans des carpelles. La fécondation d'une oosphère par un novau mâle issu d'un grain de pollen a lieu à l'intérieur de l'ovaire. Le zvgote donne un embrvon contenu dans le tégument de l'ovule, formant une graine. L'arabette est une dicotylédone, l'embryon mature possède deux cotylédons en forme d'aile (organes de réserve) à l'extrémité apicale de l'axe principal, l'hypocotyle, qui contient un méristème apical caulinaire à une extrémité et un méristème racinaire à l'autre. Après germination, la plantule se développe en une plante possédant des racines, une tige, des feuilles et des fleurs. La photographie présente cinq individus matures d'arabette.



nombreux exemples dans ce chapitre. Les principales caractéristiques de sa morphologie, de son cycle de vie et de sa reproduction sont tout d'abord décrites.

7.1 La plante modèle *Arabidopsis thaliana* a un cycle de vie court et un petit génome diploïde

L'équivalent de la drosophile pour les études du développement des plantes est *Arabidopsis thaliana*, petite espèce de la famille des Brassicaceae (anciennement nommée crucifères). Communément appelée arabette, elle présente des caractéristiques particulièrement intéressantes pour des études génétiques ou de développement. Elle est diploïde alors que de nombreuses plantes sont polyploïdes, et est dotée d'un génome relativement petit et compact, entièrement séquencé et contenant environ 27 000 gènes codant des protéines. C'est une plante annuelle formant une petite rosette de feuilles au ras du sol à partir de laquelle une tige florifère ramifiée se met en place, portant une **inflorescence** à la fin de chaque ramification. L'arabette se développe rapidement, avec un cycle de vie de 6 à 8 semaines dans des conditions contrôlées de laboratoire et, comme toutes les plantes à fleurs, des souches mutantes et des lignées peuvent facilement être conservées en grandes quantités sous forme de graines. Le cycle de vie de l'arabette est présenté dans la Fig.7.1.

Chaque fleur d'arabette (Fig. 7.2) est formée de quatre sépales entourant quatre pétales blancs ; les pétales encadrent six étamines, les organes sexuels mâles produisant le pollen contenant les gamètes mâles. D'un point de vue évolutif, les pétales, sépales et autres organes floraux sont interprétés comme des feuilles modifiées. Au centre de la fleur se trouvent les organes sexuels femelles, formés par deux carpelles soudés en un ovaire contenant les ovules. Chaque **ovule** contient une oosphère, le gamète femelle. La fécondation de ce gamète femelle survient lorsqu'un grain de pollen déposé sur la surface réceptrice des carpelles produit un tube qui pénètre le carpelle et transporte jusqu'à l'ovule deux noyaux mâles haploïdes. Un noyau mâle féconde l'oosphère, tandis que l'autre fusionne avec deux autres noyaux de l'ovule formant ainsi une cellule triploïde à l'origine d'un tissu de réserves, l'**albumen**, qui entoure les cellules de l'œuf fécondé (zygote) et fournit les ressources nutritives nécessaires au développement embryonnaire.

Après fécondation, l'embryon se développe à l'intérieur de l'ovule qui se transforme, au terme de deux semaines de développement, en une graine mature libérée par la plante. La graine restera en état de dormance jusqu'à ce que des conditions externes favorables déclenchent sa germination. Les premiers stades de la germination et de la croissance des plantules dépendent des ressources nutritives issues des **cotylédons**, feuilles embryonnaires servant d'organes de stockage. L'embryon d'arabette possède deux cotylédons et appartient donc à l'un des grands groupes de plantes à fleurs : les dicotylédones. Les membres de l'autre grand groupe, les monocotylédones, montre des embryons à un cotylédon ; ces plantes généralement à longues feuilles étroites, sont souvent des espèces vivrières comme le blé, le riz et le maïs. Le soja, la pomme de terre, la tomate, la betterave sucrière et bien d'autres légumes sont des exemples de dicotylédones importantes du point de vue agricole.

Lors de la germination, la tige et la racine s'allongent et émergent de la graine. Une fois que la tige est sortie au-dessus du sol, son activité photosynthétique démarre et les premières vraies feuilles se forment au niveau de l'apex caulinaire. Environ 4 jours après la germination, la plantule devient autonome. Les bourgeons floraux sont généralement visibles sur la jeune plante 3 à 4 semaines après la germination et s'ouvriront au bout d'une semaine. Dans des conditions idéales, le cycle de vie complet d'*Arabidopsis* se déroule en 6 à 8 semaines (voir Fig. 7.1).

Développement embryonnaire

La formation de l'embryon, ou embryogenèse, a lieu au sein de l'ovule et s'achève par la formation d'un embryon mature et dormant inclus dans une graine en attente de la germination. Au cours de l'embryogenèse, la polarité de l'axe tige-racine de la plante, ou **axe apico-basal**, est établie et les méristèmes de la tige et de la racine sont formés. Les plantes possèdent aussi une **symétrie radiaire**, soulignée par l'arrangement concentrique des différents tissus dans une tige. Cet **axe radiaire** est aussi mis en place dans l'embryon. Le développement des embryons d'arabette suit un patron assez constant de divisions cellulaires ce qui permet d'établir une carte des territoires présomptifs de l'embryon. Il est à noter que ce n'est pas le cas de tous les embryons de plantes.

7.2 Le développement embryonnaire des plantes passe par différents stades

L'arabette appartient au groupe des angiospermes, ou plantes à fleurs, un des deux groupes principaux de plantes à graines aux côtés des gymnospermes (ou conifères). Les étapes typiques du développement embryonnaire chez les angiospermes sont décrites dans l'Encart 7A. Comme l'œuf fécondé chez les animaux, le zygote principal chez les plantes subit des divisions cellulaires multiples. Les cellules ainsi formées croissent puis se différencient pour former un embryon multicellulaire. La première division du zygote est perpendiculaire à son axe d'allongement. Elle permet la formation d'une cellule apicale et d'une cellule basale, établissant ainsi une polarité initiale à l'origine de la polarité apico-basale de l'embryon puis de l'axe apico-basal de la plante. Pour beaucoup d'espèces, la première division zygotique est asymétrique et la cellule basale plus grande que la cellule apicale. Cette cellule basale générera le **suspenseur**, long de plusieurs cellules (voir Encart 7A). Ce dernier relie embryon et tissus maternels, assurant un approvisionnement en ressources nutritives. La cellule apicale, quant à elle, se divise selon un axe vertical pour former un proembryon bicellulaire, qui donnera naissance au reste de l'embryon. Chez certaines espèces, la cellule basale contribue peu à la suite du développement de l'embryon. Chez d'autres, comme l'arabette, la cellule apicale du suspenseur forme l'hypophyse de l'embryon, contribuant par la suite à la constitution du méristème et de la coiffe racinaires de l'embryon.

Les deux divisions suivantes forment un embryon de huit cellules, le **stade octant**, qui se développe en un embryon d'environ 32 cellules au **stade globulaire** (Fig. 7.3).



Fig. 7.2 Une fleur individuelle d'Arabidopsis. Barre d'échelle = 1 mm. D'après Meyerowitz, E. et al. : A genetic and molecular model for flower development in Arabidopsis thaliana. Development 1991, 113 : 157-167.



Figure 1

Chez les plantes à fleurs (angiospermes), le zygote principal est contenu dans une structure appelée ovule au sein de l'ovaire de la fleur (encadré de droite de la Figure 1). Avant fécondation, le grain de pollen déposé à la surface des papilles stigmatiques forme un tube pollinique au sein duquel deux gamètes mâles gagneront l'ovule. Un des gamètes mâles fusionne avec l'oosphère tandis que l'autre fusionne avec une autre cellule de l'ovule formant ainsi un tissu nutritif spécialisé, l'albumen. Ce dernier entoure et approvisionne en molécules nutritives l'embryon en développement.

La petite herbe annuelle *Capsella bursa-pastoris* (capselle bourse-à-pasteur) est une dicotylédone typique. La première division est asymétrique et partage le zygote en une cellule apicale et une cellule basale (Figure 1). La cellule basale se divise ensuite plusieurs

fois pour former un filament pluricellulaire, le suspenseur, qui, chez de nombreux embryons d'angiospermes, ne participe pas directement au développement embryonnaire mais aura une fonction d'absorption. Chez la capselle, cependant, il contribue à la formation du méristème racinaire. La plus grande partie de l'embryon dérive de la cellule apicale. Celle-ci subit une série de divisions stéréotypées, dont l'enchaînement précis dans différents plans donne naissance au stade cordiforme typique des dicotylédones. L'embryon mature est constitué d'un corps cylindrique central terminé aux deux extrémités par des méristèmes et de deux cotylédons.

L'embryon précoce se différencie le long de l'axe radial en trois principaux tissus : la couche externe ou épiderme, le futur tissu vasculaire qui s'étend le long de l'axe principal et des cotylédons et le tissu fondamental, future zone corticale, qui l'entoure.

La graine est issue de la maturation de l'ovule contenant les embryons (encadré de gauche de la Figure 1). Elle reste dormante jusqu'à ce que des conditions extérieures favorables déclenchent sa germination et la croissance de la plantule. Une plantule dicotylédone typique (Figure 2) comporte le méristème apical caulinaire, deux cotylédons, l'hypocotyle et le méristème apical racinaire. La plantule peut être vue comme le stade phylotypique des plantes à fleurs. Le plan d'organisation d'une plantule est simple : un axe, l'axe apico-basal, définit l'orientation principale de la plante. La tige se forme au pôle apical tandis que la racine se développe au pôle basal. Ainsi, par simplification, le méristème de la tige est désigné dans la plantule et dans la plante adulte comme le méristème apical. La tige de la plante possède aussi un axe





radiaire, bien visible dans la symétrie radiaire de l'hypocotyle et qui se poursuit dans l'épicotyle et la racine. Au centre se trouve le tissu vasculaire, entouré par la zone corticale, ou cortex, puis une couche externe d'épiderme. Formées plus tard, des structures comme les feuilles présentent un axe de symétrie dorso-ventral reliant leur face supérieure à leur face inférieure.



L'embryon s'allonge puis les cotylédons se mettent en place à l'une des extrémités tandis qu'une racine embryonnaire se forme à l'autre : c'est le **stade cordiforme**. Deux groupes de cellules indifférenciées capables de se diviser en continu, les **méristèmes apicaux**, sont localisés aux deux extrémités de l'axe d'allongement de l'embryon. Le méristème situé entre les cotylédons donne naissance à l'appareil caulinaire tandis que celui situé vers l'extrémité de la racine embryonnaire sera à l'origine de la croissance de la racine lors de la germination. La région située entre la racine embryonnaire et la future tige formera la tige embryonnaire ou **hypocotyle**. La quasi-totalité des structures de la plante adulte dérivent des méristèmes apicaux. La principale exception qui assure la croissance en épaisseur de la plante, particulièrement visible chez les plantes arborescentes, est le fait du **cambium**, un anneau de tissu méristématique secondaire de la tige et de la racine. Une fois l'embryon arrivé à maturité, les méristèmes apicaux restent quiescents jusqu'à la germination.

Il est possible d'identifier les groupes de cellules de l'embryon précoce à l'origine des structures de la plantule et de construire une carte de territoires présomptifs (Fig. 7.4). Chez l'arabette, la configuration des divisions est extrêmement reproductible jusqu'au



Fig. 7.3 Développement embryonnaire

d'Arabidopsis. Micrographie (en contraste Nomarski) de graines de type sauvage d'*A. thaliana.* Les cotylédons sont déjà visibles au stade cordiforme. L'embryon est relié aux téguments de la graine par un suspenseur filamenteux. Barre d'échelle = 20 μm.

Photographies aimablement communiquées par D. Meinke, de Meinke, D.W. : **Seed development in Arabidopsis thaliana**. In Arabidopsis, CSHLP : 1994.

Fig. 7.4 Carte des territoires présomptifs de l'embryon d'arabette. Le déroulement stéréotypé des divisions cellulaires dans les embryons de dicotylédones rend possible la cartographie, dès le stade globulaire, des trois régions à l'origine des cotylédons (vert foncé), du méristème apical (rouge), de l'hypocotyle (jaune) et du méristème racinaire (mauve) dans la plantule.

Illustration d'après Scheres, B., et al. : Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. Development 1994, **120 :** 2475-2487.

Fig. 7.5 Divisions périclinales et

anticlinales. Les divisions cellulaires périclinales sont parallèles à la surface des organes alors que les divisions anticlinales sont perpendiculaires à celle-ci.

Illustration d'après Friml, J., et al. : *Effluxdependent auxin gradients establish the apical-basal axis of* Arabidopsis. Nature 2003, **426 :** 147-153.



Fig. 7.6 Voie de signalisation de l'auxine.

En l'absence d'auxine, les protéines AUX/ IAA répriment, en s'associant à eux, l'activité des facteurs de transcription de la famille AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF), qui se lient aux séquences ADN contenant le motif TGTCTC dans les promoteurs de gènes sensibles à l'auxine. L'auxine permet au complexe ubiquitine ligase SCF/TIR1 l'ubiquitination (Ub) de la protéine AUX/IAA. Cette modification conduit à la dégradation de AUX/IAA et supprime la répression du gène sensible à l'auxine, qui peut ensuite être transcrit.

D'après Chapman, E.J., Estelle, M. : **Cytokinin** and auxin intersection in root meristems. Genome Biol. 2009, **10** : 210. doi :10.1186/ gb-2009-10-2-210



stade 16 et dès le stade octant, une carte des territoires présomptifs des principales régions de la plantule selon l'axe apico-basal peut être établie. Les cellules de la partie supérieure génèrent les cotylédons et le méristème apical, celles du niveau suivant sont à l'origine de l'hypocotyle et celles du niveau inférieur donnent, avec la partie du suspenseur participant à la constitution de l'embryon, la racine. Au stade cordiforme, la carte des territoires présomptifs est établie sans ambiguïté.

L'organisation radiaire de l'embryon est constituée de trois anneaux concentriques de tissus : l'épiderme périphérique, les tissus fondamentaux (cortex et endoderme) et le tissu vasculaire au centre. L'axe radiaire apparaît au stade octant, quand les régions adaxiales (centrales) et abaxiales (périphériques) se mettent en place. Puis des divisions périclines, dont les plans de division sont parallèles à la surface de l'organe, donnent naissance à différents anneaux de tissus et des divisions anticlines, dont les plans de division sont perpendiculaires à la surface de la structure, augmentent le nombre de cellules de chaque anneau de tissus (Fig. 7.5). Au stade 16 cellules, la couche épidermique ou couche dermatogène est établie.

Il n'est pas certain que le devenir des cellules soit déterminé à ce stade ; il pourrait aussi être dépendant de la configuration précoce de divisions cellulaires asymétriques. Il semble que le lignage cellulaire ne soit pas essentiel. L'étude de mutations a prouvé, que la division cellulaire peut être découplée de la mise en place d'une organisation générale. La mutation *fass* chez l'arabette provoque des divisions selon des plans aléatoires et perturbe donc le profil classique des divisions. Les plantules sont plus larges et courtes que les plantules sauvages. Mais bien que les plantules *fass* soient déformées, elles possèdent des tiges, des racines et même finalement des fleurs positionnées correctement et présentent la même organisation tissulaire radiaire que des plantules sauvages.

7.3 Des gradients d'auxine établissent l'axe apico-basal de l'embryon

L'auxine (acide indole-3-acétique ou IAA), une petite molécule organique, est l'un des signaux chimiques les plus importants et les plus ubiquistes du développement et de la croissance des plantes. Elle provoque des modifications du profil d'expression de gènes en favorisant l'ubiquitination et la dégradation de répresseurs transcriptionnels appelés **protéines Aux/IAA**. En absence d'auxine, ces répresseurs sont liés à des **facteurs de réponse à l'auxine** (ou **ARF** pour *Auxin-Response Factor*) et bloquent la transcription des **gènes de réponse à l'auxine**. Stimulée par l'auxine, la dégradation des protéines Aux/IAA libère les facteurs de réponse à l'auxine qui, à leur tour, peuvent activer, ou dans certains cas réprimer, ces gènes (Fig. 7.6). Parmi les gènes sensibles à l'auxine se trouvent des gènes impliqués dans la régulation de la division, de la croissance et de la détermination des cellules. Dans certains cas, l'auxine semble agir comme un morphogène classique, formant un gradient de concentration et spécifiant le devenir des cellules en fonction de leur position le long de ce gradient.

Il est démontré que l'auxine joue un rôle dès les premiers stades de l'embryogenèse chez l'arabette, en participant à l'établissement de l'axe apico-basal. Immédiatement après la première division du zygote, l'auxine est activement transportée depuis la cellule basale vers la cellule apicale où elle s'accumule. Elle est exportée de la cellule basale par des transporteurs protéiques PIN7, localisés dans la membrane plasmique de la face apicale de la cellule basale. L'auxine est nécessaire à la détermination de la cellule apicale, à l'origine de toutes les structures embryonnaires apicales telles que **Fig. 7.7** Le rôle de l'auxine dans la mise en place de l'organisation de l'embryon précoce. A gauche : l'auxine produite dans la cellule basale s'accumule dans le pré-embryon au stade deux cellules (en vert) grâce au transport baso-apical réalisé par les protéines PIN7 localisées dans les membranes apicales des cellules basales et des cellules du suspenseur (flèches violettes). Une autre protéine, PIN1, transporte l'auxine entre les deux cellules du pré-embryon (flèches rouges). La division des cellules distribue l'auxine dans l'embryon en développement. A droite : au stade globulaire, de l'auxine commence a être produite au pôle apical et la direction du transport de l'auxine s'inverse. PIN7 est alors localisée sur les membranes basales des cellules du suspenseur et les protéines PIN1 et PIN4 (flèches orange) transportent l'auxine depuis la région apicale vers les cellules les plus basales de l'embryon, constituant une zone où elle s'accumule, l'hypophyse.

D'après Friml, J., et al : *Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of* **Arabidopsis**. Nature 2003, **426 :** 147-153.

le méristème apical caulinaire et les cotylédons. Au cours des divisions cellulaires suivantes, le transport de l'auxine se poursuit à travers les cellules du suspenseur et au sein de la cellule située à la base de l'embryon jusqu'au stade globulaire de 32 cellules. Les cellules apicales de l'embryon commencent alors à produire de l'auxine et le transport polarisé de la molécule est soudain inversé. Les protéines PIN7 des cellules du suspenseur migrent vers les faces basales des cellules. D'autres gènes *PIN* sont activés et l'action conjointe des protéines PIN provoque la réorientation de l'auxine depuis la région apicale jusqu'à la région basale de l'embryon globulaire au niveau duquel vont se former l'hypocotyle, le méristème racinaire et la racine embryonnaire (Fig. 7.7).

L'expression asymétrique des homéogènes *WOX2* et *WOX8* semble être indispensable à la formation du gradient embryonnaire d'auxine. Ces deux gènes sont exprimés dans le zygote mais, après division, l'expression du gène *WOX2* se restreint à la cellule apicale et à ses descendantes tandis que *WOX8* s'exprime uniquement dans les cellules issues de la cellule basale. L'expression de *WOX8* semble être nécessaire pour maintenir l'expression continue de *WOX2* et pour la mise en place du gradient d'auxine, vraisemblablement au travers de l'effet des protéines WOX sur l'expression des protéines PIN responsables des transports d'auxine.

Les conséquences de mutations affectant la machinerie cellulaire impliquée dans le transport et la réponse à l'auxine illustrent l'importance de l'auxine dans la détermination de la région basale de l'embryon. Le gène *MONOPTEROS (MP)*, par exemple, code un facteur de réponse à l'auxine, ARF5. Les embryons mutants pour le gène *MP* ne possèdent pas d'hypocotyle ni de méristème racinaire et présentent des divisions cellulaires anormales dans les régions embryonnaires du stade octant habituellement à l'origine de ces structures.

La spécification de cellules potentiellement à l'origine de l'appareil caulinaire ou de la racine est une étape précoce de la formation des axes chez l'embryon. La mutation *topless-1* provoque un profond remaniement du devenir des cellules, transformant l'intégralité de la région apicale en une seconde région racinaire et supprimant la formation des cotylédons et du méristème apical caulinaire. Normalement, la protéine TOPLESS réprime, dans la partie supérieure de l'embryon précoce, l'expression de gènes impliqués dans la spécification racinaire, agissant comme un co-répresseur transcriptionnel en formant un complexe avec des protéines Aux/IAA et les facteurs de réponse à l'auxine dont elles régulent l'activité.

La mutation *topless-1* est sensible à la température et peut donc être mise en jeu à différentes périodes au cours du développement simplement en changeant la température à laquelle sont cultivés les embryons. De telles manipulations montrent que la région apicale peut être re-spécifiée comme racine entre les stades globulaire et cordiforme, même si des signaux moléculaires associés au développement des cotylédons et du méristème apical caulinaire sont déjà présents. Ceci suggère que la détermination apicale des cellules, normalement établie à ce stade du développement embryonnaire, n'est en fait pas irréversible.

Les mutations du gène *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) bloquent totalement la formation du méristème apical caulinaire mais n'ont aucun effet sur le méristème racinaire ou sur d'autres parties de l'embryon. *STM* code un facteur de transcription également nécessaire au maintien des cellules des méristèmes caulinaires de la plante adulte dans un état pluripotent. Le profil d'expression de *STM* se met en place





Fig. 7.8 Coupe dans un embryon d'arabette au stade cordiforme tardif montrant l'expression de *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*. A ce stade, l'ARN de *STM* (en rouge) est exprimé dans les cellules localisées entre les cotylédons. Barre d'échelle = 25 μm.

Photographie aimablement communiquée par K. Barton. Long, J.A., Barton, K.B. : **The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis**. Development 1999, **125** : 3027-3035. progressivement, comme dans le cas de nombreux gènes caractérisant le méristème apical caulinaire. Son expression est détectée dès le stade globulaire dans une ou deux cellules puis plus tard dans la région située entre les deux cotylédons (Fig. 7.8).

7.4 Les cellules somatiques de la plante peuvent donner naissance à des embryons et des plantules

Les jardiniers le savent bien, les plantes ont d'incroyables capacités de régénération. Une nouvelle plante complète peut se former à partir d'un fragment de tige, de racine ou même de l'extrémité coupée d'une feuille, ce qui reflète une différence importante de potentiel de développement entre cellules de plantes et cellules animales. Chez les animaux, à quelques exceptions près, détermination et différenciation cellulaires sont irréversibles. Au contraire, de nombreuses cellules somatiques de plantes restent totipotentes. Des cellules de racines, feuilles, tiges, voire même, pour certaines espèces, un protoplaste isolé, une cellule dont la paroi a été éliminée par un traitement enzymatique, peuvent être cultivés et, sous l'effet d'un traitement par des hormones de croissance appropriées, donner naissance à une nouvelle plante (Fig. 7.9). In vitro, les cellules végétales génèrent des amas de cellules passant par un stade rappelant le développement embryonnaire normal, bien que les patrons des divisions cellulaires soient différents. Ces « corps embryoïdes » peuvent donner des plantules. Les cellules de plantes peuvent aussi générer un cal, masse de cellules apparemment désorganisées, qui, à son tour, peut former de nouveaux méristèmes de tige ou de racine et ainsi être à l'origine de nouvelles parties aériennes et de racines. Cette capacité de régénération à partir de cellules somatiques permet d'obtenir facilement des plantes transgéniques en utilisant la bactérie pathogène de plantes Agrobacterium tumefaciens comme vecteur du gène à transférer (Encart 7B).

Deux idées importantes pour l'étude du développement des plantes peuvent être déduites de la capacité de cellules somatiques isolées à donner des plantes entières. La première est l'importance réduite, voire nulle, des déterminants maternels dans l'embryogenèse des plantes, puisqu'il est peu vraisemblable que d'aussi nombreuses cellules somatiques contiennent encore de tels déterminants. La seconde est qu'un bon nombre de cellules d'une plante adulte ne sont pas totalement déterminées mais restent totipotentes. Bien sûr, cette totipotence semble s'exprimer seulement dans certaines conditions, mais cela reste néanmoins très différent du cas des cellules animales, comme si les cellules de plantes ne présentaient pas de mémoire à long terme de leur développement ou si cette mémoire était facilement effacée.



Fig. 7.9 La culture de cellules somatiques d'une plante mature peut conduire à la formation d'un embryon et régénérer une nouvelle plante. L'illustration montre la formation d'une plante à partir d'une seule cellule. Si une petite partie de tige ou d'une feuille est placée sur un milieu gélosé solide, avec des nutriments adéquats et des hormones de croissance, les cellules se divisent pour former une masse désorganisée de cellules appelée cal. Les cellules de cal sont

alors séparées et cultivées en milieu liquide contenant les hormones de croissance appropriées. Certaines de ces cellules se divisent pour former des groupes de cellules ressemblant au stade globulaire d'un embryon de dicotylédones qui, en poursuivant la culture sur milieu solide, passent par le stade cordiforme et les stades ultérieurs pour régénérer une plante entière complète.

ENCART 7B Plantes transgéniques

L'infection des tissus d'une plante en culture en présence de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, un agent à l'origine des tumeurs de la maladie du collet, est l'une des façons les plus courantes de générer des plantes transgéniques. *Agrobacterium* est un ingénieur génétique naturel. Il contient un plasmide, le plasmide Ti, portant les gènes nécessaires à la transformation et à la prolifération des cellules infectées jusqu'à la formation d'un cal. Au cours de l'infection, une portion du plasmide, l'ADN-T (en rouge dans la Figure 1), est transférée dans le génome de la cellule hôte où elle s'intègre de façon stable. Les gènes insérés

de façon expérimentale au sein de l'ADN-T pourront ainsi être transférés au sein des chromosomes des cellules de la plante. Les plasmides Ti utilisés comme vecteurs pour le transfert de gènes chez les dicotylédones sont modifiés de telle sorte qu'ils ne produisent plus de tumeurs mais conservent leur capacité à transférer l'ADN-T. Les cellules des cals génétiquement modifiées peuvent être cultivées pour obtenir de nouvelles plantes entières transgéniques qui portent les gènes introduits dans toutes leurs cellules et qui pourront les transmettre à leur descendance.

Figure 1



7.5 L'expansion cellulaire est un processus majeur dans la croissance des plantes et leur morphogenèse

La croissance des plantes est assurée par l'effet combiné de divisions et d'expansions cellulaires. Dans un tissu de plante en croissance, ce dernier processus peut conduire à une augmentation de volume d'un facteur 50 et l'augmentation de taille des plantes est essentiellement due à la croissance cellulaire. Le moteur de l'augmentation de taille des cellules est la pression hydrostatique, ou pression de turgescence, exercée sur la paroi cellulaire suite à une entrée d'eau dans la vacuole par osmose (Fig. 7.10). Cette croissance cellulaire implique la synthèse et le dépôt de nouveaux composés pariétaux et est un exemple de **dilatation dirigée**, processus dans lequel une augmentation de la pression hydrostatique intracellulaire provoque un changement marqué de forme dans une direction privilégiée. La dilatation dirigée est aussi impliquée dans le développement de la chorde des vertébrés et l'allongement corporel des nématodes (voir Chapitre 9). Chez les plantes, la direction de la croissance cellulaire dépend de l'orientation des fibrilles de cellulose dans la paroi des cellules. L'expansion se produit principalement dans la direction de moindre résistance de la paroi, perpendiculaire à l'axe d'allongement des fibrilles. L'orientation des fibrilles de cellulose dans la paroi cellulaire est déterminée par les microtubules du cytosquelette, avec lesquels interagissent les complexes d'enzymes qui synthétisent la cellulose de la paroi cellulaire. Les hormones de croissance végétales, comme l'éthylène ou les gibbérellines modifient l'orientation du dépôt des fibrilles et peuvent donc modifier la direction de **Fig. 7.10 Agrandissement d'une cellule de plante.** Les cellules des plantes s'acroissent en taille quand l'eau entre dans leurs vacuoles, entraînant une augmentation de la pression hydrostatique intracellulaire. La cellule s'allonge dans une direction perpendiculaire à l'orientation des fibrilles de cellulose de la paroi cellulaire.





l'expansion. L'auxine, quant à elle, favorise l'expansion en relâchant la structure de la paroi cellulaire.

La forme particulière d'une feuille est obtenue par un patron complexe de divisions et d'élongation cellulaires selon les axes proximo-distal et médio-latéral de l'excroissance foliaire. Ce patron est vraisemblablement mis en place par une région située à la base de la feuille. L'élongation cellulaire joue un rôle majeur dans l'expansion de la lame foliaire aux stades avancés de la croissance foliaire. Deux mutations qui affectent la forme de la lame foliaire en modifiant la direction de l'élongation cellulaire ont été identifiées. Les feuilles du mutant *angustifolia* de l'arabette présentent la même longueur que celles de l'individu sauvage mais sont beaucoup plus étroites (Fig. 7.11). Au contraire, les mutations *rotundifolia* réduisent la longueur des feuilles par rapport à leur largeur. Aucune de ces mutations n'affecte le nombre des cellules de la feuille. Par contre, l'examen des feuilles en développement montre que ces mutations affectent la direction de l'allongement des cellules en croissance.

RÉSUMÉ

Chez de nombreuses plantes, le développement embryonnaire précoce se caractérise par une division asymétrique du zygote principal spécifiant les régions apicales et basales. Le développement embryonnaire des plantes à fleurs met en place les

Fig. 7.11 La forme des feuilles d'arabette est modifiée par des mutations qui affectent l'allongement des cellules. La mutation angustifolia donne des plantes ayant des feuilles étroites, alors que les mutations rotundifolia donnent des feuilles courtes et plus rondes.

Photographie aimablement communiquée par H. Tsukaya, de Tsuge, T., et al. : **Two independent and polarized processes of cell elognation regulate blade expansion in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh**. Development 1996, **122** : 1589-1600. méristèmes caulinaire et racinaire à partir desquels la plante adulte se développe. Des gradients d'auxine sont impliqués dans la spécification de l'axe apico-basal de l'embryon d'arabette. Une différence majeure entre plantes et animaux réside dans le fait que, en culture, une unique cellule somatique de plante peut, en passant par un stade rappelant l'embryon, régénérer une nouvelle plante entière, ce qui révèle la persistance du caractère totipotent de certaines cellules différenciées des plantes.



Méristèmes

Chez les plantes, la plupart des structures adultes proviennent de deux régions de l'embryon, les méristèmes caulinaires et racinaires, qui sont conservées après germination. Le méristème caulinaire embryonnaire, par exemple, deviendra le méristème apical de la tige de la plante en croissance, donnant naissance à toutes les tiges, feuilles et fleurs. Alors que la tige s'allonge, des extensions latérales issues du méristème donnent naissance aux feuilles et aux ramifications de la tige. Dans les tiges florifères, le méristème végétatif est converti en un méristème capable de former des **méristèmes floraux** donnant naissance à des fleurs à la place des feuilles. Chez l'arabette, par exemple, le méristème apical caulinaire passe d'un méristème produisant des feuilles insérées en spirale à un **méristème inflorescentiel** produisant des méristèmes floraux, et donc des fleurs, insérées en spirale. Les premiers stades d'un organe en formation sont appelés des **primordia (primordium** au singulier). Chaque primordium comporte un petit nombre de **cellules fondatrices** produisant une nouvelle structure par division et croissance des cellules, accompagnée d'une différenciation.

Un décalage temporel se produit habituellement dans l'initiation de la mise en place de deux feuilles successives au niveau du méristème apical caulinaire, qui construit donc une tige organisée en modules répétitifs. Chacun de ces modules comporte un entre-nœud (l'ensemble des cellules produites par le méristème entre deux initiations foliaires successives), un nœud et sa feuille associée, et un bourgeon axillaire (Fig. 7.12). Le bourgeon axillaire lui-même contient un méristème, appelé méristème caulinaire latéral, se formant à la base de la feuille. La croissance des bourgeons latéraux situés juste en dessous du bourgeon apical est inhibée, phénomène appelé dominance apicale. La dominance apicale est causée par l'auxine produite par l'apex caulinaire et qui, en diffusant vers les parties basales, inhibe le développement des méristèmes latéraux. L'existence d'un inhibiteur diffusible a été démontrée en plaçant un apex excisé au contact d'un bloc d'agar, qui se révèle capable ensuite de provoquer, seul, l'inhibition de la croissance latérale. L'auxine produite par le bourgeon apical est transportée vers les parties basses de la tige et supprime le débourrement (aussi appelé débourrage) des bourgeons situés dans sa zone d'influence. Si le bourgeon apical est supprimé, la dominance apicale est aussi levée et les bourgeons latéraux commencent à croître (Fig. 7.13). L'application d'auxine sur la tige ainsi coupée restaure l'effet inhibiteur du bourgeon apical.

La croissance des racines ne s'effectue pas de façon aussi modulaire mais il existe des caractéristiques communes, comme le fait que de nouveaux méristèmes latéraux formés par le méristème apical racinaire donnent naissance à des racines latérales.

Les méristèmes apicaux caulinaires et les méristèmes apicaux racinaires fonctionnent selon les mêmes principes mais il existe des différences importantes entre eux. Les



Fig. 7.12 Les tiges croissent de façon modulaire. Le méristème apical caulinaire produit, de façon répétée, un module de base. Le module unitaire de la tige végétative comporte un entre-nœud, un nœud, une feuille et un bourgeon axillaire (à partir duquel une ramification de la tige peut se développer). Les modules successifs sont présentés ici dans différentes teintes de vert. Au fur et à mesure de la croissance de la plante, les entre-nœuds situés sous le méristème s'allongent et les feuilles s'élargissent.

Illustration d'après Alberts, B., et al. : Molecular Biology of the Cell, 2nd edition. New York : Garland Publishing, 1989.



Fig. 7.13 La dominance apicale chez les plantes. A gauche : la croissance des bourgeons latéraux est inhibée par le méristème apical situé au-dessus d'eux. Si la partie supérieure de la tige est enlevée, les bourgeons latéraux commencent à se développer. A droite : une expérience montrant que la dominance apicale est due à l'inhibition de la croissance des bourgeons latéraux par une substance sécrétée par la région apicale. Cette substance est l'hormone végétale auxine.



Fig. 7.14 Organisation du méristème

apical de tige d'arabette. En coupe longitudinale, le méristème est organisé en trois couches principales L1, L2, et une couche plus interne, soulignées par les lignes jaunes. D'un point de vue fonctionnel, il est divisé en une zone centrale (en rouge), une zone profonde (en jaune) et une zone périphérique (en bleu). Les cellules souches ou initiales sont situées dans la zone centrale, tandis que la zone périphérique contient des cellules en prolifération qui formeront les feuilles et les tiges latérales. La zone profonde forme les tissus centraux (moelle) de la tige. principes de base de la structure et des propriétés des méristèmes seront illustrés à l'aide du méristème apical caulinaire puis les spécificités des racines seront discutées.

7.6 Un méristème contient une petite zone centrale de cellules souches capable de s'auto-renouveler

Chez les angiospermes, les méristèmes caulinaires apicaux font rarement plus de 250 µm de diamètre et contiennent quelques centaines de cellules indifférenciées relativement petites, capables de se diviser. Au cours du développement normal, l'essentiel des divisions cellulaires a lieu au sein des méristèmes ou peu de temps après que les cellules ont quitté le méristème. Les cellules quittent la périphérie du méristème pour former des organes comme les feuilles ou les fleurs et sont remplacées grâce à l'activité d'une petite zone centrale de cellules souches se divisant à un rythme lent, les **cellules initiales** de l'apex du méristème (Fig. 7.14). Chez l'arabette, cette zone est constituée de 12 à 20 cellules. Les cellules initiales se comportent de la même façon que les cellules souches animales (voir Chapitre 8). Elles peuvent se diviser pour donner une cellule souche fille et une cellule fille perdant ses propriétés de cellule souche. Cette cellule fille continue de se diviser et ses descendantes sont ainsi poussées vers la zone périphérique du méristème, où elles deviennent des cellules à l'origine d'un nouvel organe ou d'un entre-nœud, quittent le méristème et se différencient. Au centre du méristème, un très petit nombre de cellules souches persistent tout au long de la vie de la plante.

La capacité des cellules méristématiques à s'auto-renouveler est maintenue grâce à des cellules entourant la zone centrale du méristème et formant le centre organisateur. C'est le microenvironnement maintenu par le centre organisateur qui donne aux cellules souches leur identité.

L'état indéterminé des cellules souches méristématiques est confirmé par le fait que les méristèmes sont capables de régulation. Si, par exemple, un méristème caulinaire de plantule est divisé en deux ou quatre parties par des incisions verticales, chaque partie se réorganise en un méristème complet, donnant naissance à un appareil caulinaire normal. Un méristème normal pourra régénérer si quelques cellules du centre organisateur accompagnent les cellules souches sus-jacentes. Si un méristème apical caulinaire est totalement supprimé, aucun nouveau méristème apical ne se forme mais le méristème ébauché à la base de la feuille devient apte à se développer et forme une tige latérale. En présence du méristème originel, ce méristème reste inactif, puisque les méristèmes actifs inhibent le développement d'autres méristèmes situés à proximité du fait, entre autres facteurs, du transport de l'auxine depuis l'apex de la tige. Cette régulation illustre le fait que des interactions cellule-cellule jouent un rôle majeur dans la détermination cellulaire au sein du méristème.

7.7 La taille de l'aire occupée par les cellules souches dans le méristème est maintenue constante par une boucle de rétroaction en direction du centre organisateur

De nombreux gènes contrôlent le comportement des cellules dans le méristème. Le gène *STM*, impliqué dans la spécification du méristème caulinaire dans le développement

Fig. 7.15 Régulation de la population de cellules souches dans un méristème de tige. Des signaux intercellulaires contrôlent la position et la taille de la population de cellules souches dans le méristème de tige d'arabette. En haut : le centre organisateur (mauve) exprime le facteur de transcription WUS qui agirait comme un signal intercellulaire (flèche rouge) participant à la spécification et au maintien de l'état souche des cellules sus-jacentes (orange). Les cellules souches produisent et sécrètent la protéine signal CLAVATA3 (CLV3 ; points orange), qui migre latéralement et vers le bas et réprime indirectement la transcription du gène *WUS* dans les cellules voisines, agissant *via* ses récepteurs protéiques présents à la surface de la membrane plasmique, CLV1 et CLV2. CLV3 limite ainsi l'extension de l'aire des cellules souches (lignes barrées bleues). Les cellules générées par les cellules souches sont repoussées vers la zone périphérique du méristème (jaune pâle), où elles sont recrutées pour former les primordia foliaires. En bas : boucle de rétrocontrôle négatif limitant l'expression de *WUS*. Les protéines WUS produites par les cellules du centre organisateur migrent dans les cellules sus-jacentes où elles induisent la production de CLV3. En retour, CLV3 supprime l'expression de *WUS* par l'intermédiaire de CLV1/2.

D'après Brand U., et al. : **Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop** regulated by CLV3 activity. Science 2000, 289 : 635-644.

de l'embryon d'arabette (voir Section 7.3) est, par exemple, exprimé dans l'intégralité des méristèmes adultes mais ne s'exprime plus dès que les cellules participent à la formation d'un primordium d'organe. Il semble que son rôle soit de maintenir les cellules méristématiques dans un état indifférencié, étant donné que la perte de la fonction STM s'accompagne de l'entrée de toutes les cellules dans la formation des ébauches d'organes. Au contraire, les mutations dans les gènes *CLAVATA (CLV)* d'arabette accroissent la taille du méristème en augmentant le nombre des cellules souches. Normalement, le nombre de cellules souches est maintenu à peu près constant tout au long de la vie de la plante par le processus de division asymétrique, malgré la sortie permanente de cellules issues de cette population cellulaire. Le rôle des gènes *CLV* dans la régulation du nombre de cellules souches est bien connu et implique des rétro-contrôles entre les cellules souches et le centre organisateur sous-jacent.

Chez l'arabette, les cellules du centre organisateur expriment le facteur de transcription à homéoboîte WUSCHEL (WUS). Celui-ci est nécessaire à la production d'un signal donnant aux cellules sus-jacentes leur caractère de cellules souches. Au moins une partie de ce signal semble provenir de la protéine WUS elle-même, transmise par les cellules du centre organisateur aux cellules voisines via les plasmodesmes. Les mutations de WUS provoquent la disparition des cellules souches et l'arrêt de la croissance de la tige, tandis que sa surexpression augmente le nombre de cellules souches. Les cellules souches expriment CLAVATA3 (CLV3), codant une protéine sécrétée qui réprime indirectement l'action de WUS. Cette boucle de rétroaction pourrait contrôler l'activité de WUS dans le centre organisateur et supprimer son activation dans les cellules voisines, limitant ainsi l'extension de son expression (Fig. 7.15). Cette boucle pourrait aussi réguler l'étendue de la zone contenant les cellules souches au-dessus du centre organisateur. Si le nombre de cellules souches chute temporairement, par exemple, moins de protéines CLV3 sont produites et l'activité de WUS est accrue, augmentant ainsi le nombre de cellules souches. D'autres protéines CLAVATA sont impliquées dans cette boucle de rétroaction (voir Fig. 7.15).

Des méristèmes peuvent être induits ailleurs dans la plante par l'expression incorrecte de gènes impliqués dans la spécification de l'identité cellules souches. Ceci est une nouvelle indication que cette dernière est conférée par des interactions cellule-cellule et est non spécifique d'une lignée cellulaire de l'embryon.

7.8 Le devenir des cellules des différentes couches du méristème peut être modifié en changeant leur position

L'observation du devenir des cellules des différentes couches du méristème fournit une autre preuve que le devenir des cellules méristématiques est déterminé par leur position dans le méristème et donc par les signaux intercellulaires auxquels elles sont exposées En plus d'être organisé en zones centrale et périphérique, le méristème apical d'arabette, comporte trois couches cellulaires distinctes (Fig. 7.16). La couche la plus externe, L1, est constituée d'une seule épaisseur de cellules, comme l'est aussi L2, située juste en dessous d'elle. Dans L1 et L2, les divisions cellulaires sont





anticlines, la nouvelle paroi cellulaire se disposant dans un plan perpendiculaire aux couches, ce qui maintient l'organisation. Dans la couche la plus interne, L3, les divisions se font dans toutes les directions. L1 et L2 constituent une zone appelée *tunica* et L3 une zone appelée *corpus*.

Des mutations distinguables, telles que des changements dans la pigmentation ou dans le degré de ploïdie du noyau, permettent de suivre le devenir des cellules présentes dans les différentes couches et d'identifier les tissus qu'elles génèrent. Lorsqu'une couche entière est ainsi génétiquement différente des autres, l'organisme est qualifié de **chimère périclinale** (Fig. 7.17) et le devenir des cellules issues de cette couche peut être suivi. Comme dans le cas des embryons animaux, les chimères sont des organismes constitués de cellules de deux génotypes différents (voir Section 3.9). Des chimères de plantes peuvent être obtenues en induisant des mutations dans le méristème apical d'une graine ou d'un apex de tige par irradiations aux rayons X, ou par traitement chimique tel que par la colchicine qui induira une polyploïdie.

La couche L1 donne naissance à l'épiderme qui couvre toutes les structures produites par l'appareil caulinaire. L2 et L3 contribuent ensemble à la formation du cortex et des structures vasculaires. Les feuilles et les fleurs sont principalement issues de L2, L3 participant surtout à la formation de la tige. Même si les trois couches conservent leur identité dans la partie centrale du méristème pendant de longues périodes de croissance, les cellules des couches L1 et L2 se divisent occasionnellement de façon péricline, les nouvelles parois cellulaires se formant parallèlement à la

Fig. 7.16 Le méristème apical d'arabette. En haut : micrographies électroniques en balayage montrant l'organisation du méristème d'un jeune apex végétatif d'arabette. La plante est un mutant *clavata1,* qui présente un apex élargi permettant de visualiser plus facilement les primordia foliaires (L) et le méristème (M). Barre d'échelle = 10 µm. Schéma du bas : diagramme d'une coupe verticale à travers l'apex d'une tige. La structure en trois couches du méristème est visible dans la partie la plus apicale. Dans les couches 1 (L1) et 2 (L2), les plans de divisions cellulaires sont anticlinaux, donc perpendiculaires à la surface de la tige. Les cellules de la couche 3 (L3, le corpus) peuvent se diviser selon tous les plans. Un primordium foliaire en formation est présenté.

Reproduit avec l'autorisation de Bowman J. ed. Arabidopsis An Atlas of Morphology and Development. Springer-Verlag, 1994.



Fig. 7.17 Un méristème de chimère périclinale composé de cellules de deux génotypes différents. Les cellules de L1 sont diploïdes. Les cellules de L2 sont tétraploïdes, c'est-à-dire ont le double du nombre normal de chromosomes ; elles sont plus grandes et faciles à reconnaître.

Illustration d'après Steeves, T.A., Sussex, I.M. : Patterning in Plant Development. *Cambridge : Cambridge University Press, 1989.* surface du méristème. Une des deux cellules produites change donc de couche. Cette cellule migrante évolue alors conformément à sa nouvelle position, indiquant ainsi que le devenir d'une cellule n'est pas strictement déterminé par sa couche d'origine et qu'une signalisation cellulaire est impliquée dans la spécification ou le changement de son devenir dans la nouvelle position qu'elle a acquise. Le schéma de division anticlinale dans la couche L2 est perturbé par les divisions périclines et anticlines accompagnant la formation des ébauches foliaires.

Le facteur de transcription Knotted-1 du maïs est homologue du facteur STM de l'arabette. Comme STM, il s'exprime dans l'intégralité du méristème caulinaire et permet de maintenir les cellules dans un état indifférencié. Ce facteur de transcription est transmis directement de cellule à cellule. Le gène *KNOTTED-1* est exprimé dans toutes les couches sauf L1, mais la protéine Knotted-1 est présente dans cette couche, ce qui suggère un passage de cellule à cellule, vraisemblablement *via* les plasmodesmes. Chez des mutants gain de fonction de *Knotted-1* pour lesquels l'expression du gène est forcée dans les feuilles, la protéine Knotted-1, fusionnée avec une protéine verte fluorescente, a pu être détectée migrant depuis les couches les plus internes de la feuille vers l'épiderme mais non dans la direction opposée.

7.9 La carte des territoires présomptifs du méristème apical caulinaire embryonnaire peut être construite par analyse clonale

Des études menées il y a plusieurs décennies ont permis de déterminer comment le méristème apical caulinaire embryonnaire intervient dans le développement de la plante tout au long de sa vie. Ces études entendaient préciser le devenir de chaque « initiale embryonnaire », nom donné aux cellules souches à l'époque, et si des régions particulières des méristèmes embryonnaires donnent naissance à des régions particulières de la plante adulte. Les cellules initiales peuvent être marquées par mutagenèse aux rayons X ou en activant des transposons, pour donner des cellules de couleur différente du reste de la plante par exemple. Si les cellules marquées et leur descendance immédiate ne forment qu'une partie d'une couche du méristème (et non pas la totalité comme dans une chimère périclinale), cette zone conduira à la formation de secteurs de cellules marquées visibles dans les tiges et autres organes lors de la croissance de la plante ; ce type de chimère est appelée chimère mériclinale (Fig. 7.18). Le devenir de chaque cellule initiale marquée dans des chimères mériclinales peut être déterminé par une analyse clonale similaire à celle utilisée chez la drosophile (voir Encart 2H).

Chez le maïs, les secteurs marqués commencent habituellement à la base d'un entrenœud et s'étendent vers l'apex pour se terminer au sein d'une feuille. Certains secteurs incluent seulement un entre-nœud et une feuille, représentant la descendance d'une cellule initiale embryonnaire sortie du méristème avant la formation du primordium foliaire suivant. D'autres, au contraire, s'étendent sur de nombreux entre-nœuds, indiquant que certaines cellules initiales embryonnaires restent longtemps dans le méristème et contribuent à la formation d'une succession de nœuds et d'entre-nœuds. Chez le tournesol, des clones marqués s'étendent sur plusieurs entre-nœuds jusqu'à la fleur, montrant qu'une même cellule initiale peut participer à la formation de feuilles et de fleurs.

Grâce à l'analyse de centaines de chimères mériclines, les cartes des territoires présomptifs des méristèmes caulinaires embryonnaires de plusieurs espèces ont pu être élaborées, mettant ainsi en évidence les propriétés du méristème caulinaire et son fonctionnement normal lors du développement. Ces cartes des territoires présomptifs sont fondées sur des probabilités : en effet, il n'est pas possible de connaître précisément la position de la cellule marquée au sein du méristème embryonnaire qui est inaccessible au sein de la graine.

La carte des territoires présomptifs du méristème caulinaire embryonnaire du maïs indique que les trois cellules les plus apicales de L1 donnent naissance à l'inflorescence mâle (la panicule ; Fig. 7.19). Le reste du méristème peut être divisé en cinq niveaux de cellules produisant des entre-nœuds et des feuilles et formant des domaines concentriques se superposant sur la carte des territoires présomptifs. Le domaine le plus externe participe à la formation du module entre-nœud-feuille le plus précoce, les domaines plus internes généreront successivement les entre-nœuds et feuilles situés dans la partie la plus apicale de la tige. Une carte des territoires présomptifs du méristème caulinaire apical embryonnaire d'arabette a été construite de façon similaire (Fig. 7.20). La plus



Fig. 7.18 Un plant de tabac chimère mériclinale. Cette plante s'est développée à partir d'un méristème caulinaire embryonnaire dans lequel une mutation albinos est survenue dans la couche L2. L'aire affectée occupe un tiers de la circonférence totale de la tige, suggérant qu'il existe trois cellules apicales initiales dans le méristème apical embryonnaire.

Photographie aimablement communiquée par S. Poethiq.



Fig. 7.19 Carte des territoires présomptifs du méristème apical caulinaire d'un embryon mature de maïs. Chez le maïs, les primordia des six premières feuilles sont déjà présents dans l'embryon mature et sont exclus de l'analyse. Au moment du marquage, le méristème contenait environ 335 cellules qui génèrent 12 feuilles supplémentaires, les inflorescences femelles et l'inflorescence mâle terminale (épi et panicule). Une coupe longitudinale à travers le dôme embryonnaire apical (le méristème apical) est présentée sur la gauche. L'analyse clonale montre qu'il peut être divisé en six domaines superposés verticalement, chacun comprenant un ensemble de cellules initiales à l'origine d'une partie de la plante. Le nombre de cellules initiales dans les couches L1 et L2 de chaque domaine au stade embryonnaire peut être déduit de l'expansion finale des secteurs marqués dans la plante mature (voir texte). Le devenir de chaque domaine, estimé à partir des résultats de nombreuses analyses clonales, est présenté sur la droite. Le domaine 6, incluant les trois cellules méristématiques les plus apicales de L1, formera l'inflorescence mâle terminale. Le devenir des cellules des autres domaines est moins bien défini. Le domaine 5, par exemple, correspondant à environ 8 cellules de L1 entourant le domaine 6 et les quatre cellules de L2 sous-jacentes, peut contribuer aux nœuds 16 à 18, le domaine 4 aux nœuds 14 à 18 et le domaine 3 aux nœuds 12 à 15. Les inflorescences femelles, qui se développent à la base des feuilles dérivent des domaines correspondants. Illustration d'après McDaniel, C.N., Poethig, R.S. : Cell lineage patterns in the shoot apical meristem of the germinating maize embryo. Planta 1988, 175: 13-22.

grande partie du méristème donne naissance aux six premières feuilles tandis que le reste de l'appareil aérien, notamment les inflorescences, dérive d'un très petit nombre de cellules embryonnaires du centre du méristème. Contrairement au maïs, le nombre de feuilles chez *Arabidopsis* n'est pas fixe et la croissance est dite **indéterminée**. Il n'y a pas de relation entre lignée cellulaire particulière et structure particulière. La position dans le méristème est décisive dans la détermination du devenir cellulaire. Cependant les cellules germinales dérivent toujours de la couche L2, qui est constituée de façon clonale. Dans ce cas précis, un lien entre devenir et lignée cellulaire peut être établi.

Les expériences d'analyse clonale permettent de conclure que les cellules initiales contribuant à une structure donnée sont simplement celles qui sont présentes dans la région appropriée du méristème à ce moment ; elles n'ont pas reçu de pré-spécification dans l'embryon pour devenir, par exemple, cellules de fleur ou de feuille.

7.10 Le développement du méristème est dépendant de signaux issus d'autres parties de la plante

Dans quelle mesure le fonctionnement d'un méristème dépend-il du reste de la plante ? Un méristème semble avoir une relative autonomie. Isolé de ses tissus adjacents par excision, il continuera de se développer même si c'est à un rythme plus lent. Isolé



Fig. 7.20 Carte probabiliste des territoires présomptifs du méristème de tige de l'embryon d'arabette. La couche L2 du méristème est représentée aplatie et vue de l'apex. Les numéros identifient la feuille, repérée sur la plante au-dessous, à laquelle contribue chaque groupe de cellules méristématiques et soulignent la séquence de formation des feuilles. L'inflorescence (i) est dérivée d'un petit nombre de cellules au centre de la couche.

D'après Irish, V. E. : **Cell lineage in plant development.** Curr Opin. Genet. Dev. 1991, **1**: 169-173.



et mis en culture, le méristème caulinaire apical de différentes plantes croît et forme un appareil aérien complet avec des feuilles si auxine et cytokinine, des hormones de croissance, sont ajoutées au milieu. Cependant, le comportement du méristème *in situ*, est influencé de manière plus fine par des interactions avec le reste de la plante.

Le méristème apical de maïs, comme il a déjà été dit, donne naissance à une succession de nœuds et forme finalement l'inflorescence mâle. Le nombre de nœuds formés avant floraison, généralement compris entre 16 et 22, n'est pas sous le contrôle du seul méristème comme le démontrent des cultures d'apex de tiges comprenant le méristème apical ainsi qu'un ou deux primordia foliaires. Les méristèmes issus de plantes ayant déjà formé jusqu'à 10 nœuds donnent des plants de maïs normaux avec le nombre habituel de nœuds. Le méristème isolé de maïs n'a donc pas de mémoire du nombre de nœuds qu'il a déjà formés et répète le processus depuis le début. Ainsi, le méristème lui-même n'est pas déterminé dans l'embryon pour former un nombre précis de nœuds et, *in vivo*, le contrôle du nombre de nœuds formés fait nécessairement intervenir des signaux envoyés vers le méristème depuis le reste de la plante.

7.11 L'activité de gènes configure les axes proximo-distal et adaxial-abaxial des feuilles issues du méristème apical

Les feuilles se mettent en place à partir de groupes de cellules fondatrices situées dans la partie périphérique du méristème apical caulinaire. Le développement foliaire commence par l'apparition d'un bombement latéral de l'apex qui forme le **primordium foliaire** (Fig. 7.21). Cette petite protrusion est le résultat d'une multiplication cellulaire localement plus intense et de modifications des orientations de divisions cellulaires, ainsi que de changements dans l'expansion directionnelle des cellules.

Deux nouveaux axes propres aux futures feuilles sont mis en place dans le primordium foliaire : l'axe proximo-distal (de la base de la feuille à son extrémité) et l'**axe adaxial-abaxial** (de la face supérieure à la face inférieure de la feuille, et appelé aussi axe dorso-ventral). L'axe adaxial-abaxial est nommé en référence à l'axe radiaire de la tige. La face supérieure de la feuille dérive de cellules proches du centre selon cet axe (adaxial) tandis que la face inférieure dérive de cellules périphériques Fig. 7.21 Phyllotaxie. Pour les tiges où les feuilles sont arrangées en spirale, les primordia foliaires apparaissent séquentiellement dans le méristème selon un patron d'une grande régularité. Les primordia foliaires se développent sur le côté du dôme apical, juste à l'extérieur de la région du proméristème. Un nouveau primordium foliaire se forme légèrement au-dessus, selon un angle radiaire fixe par rapport à la feuille précédente, engendrant souvent un arrangement hélicoïdal des primordia visible depuis l'apex. En haut : vues latérales de l'apex de la tige. En bas : vues de haut en bas de coupes de l'apex de la tige près du sommet, aux stades successifs de développement montrés dans les schémas du haut.

Illustration du haut d'après Poethig, R.S., Sussex, I.M. : **The cellular parameters of** *leaf development in tobacco : a clonal analysis*. Planta 1985, **165 :** 170-184. Illustration du bas d'après Sachs, T. : Pattern Formation in Plant Tissues. *Cambridge : Cambridge University Press,* 1994. de la tige (abaxial). Les deux faces de la feuille réalisent des fonctions différentes et ont une organisation spécialisée, la face supérieure étant dédiée à la captation de l'énergie solaire et à la photosynthèse. Chez l'arabette, l'aplatissement dorso-ventral de la feuille a lieu après le début du développement des primordia foliaires, alors que chez les monocotylédones comme le maïs, la feuille est aplatie dès son émergence. L'établissement de la polarité adaxiale-abaxiale exploite donc probablement des informations de position selon l'axe radiaire du méristème.

Les primordia foliaires d'arabette émergent du méristème caulinaire avec des programmes différents de développement dans les moitiés adaxiales et abaxiales. Cette asymétrie est manifeste dès le début, puisque le primordium foliaire présente, en coupe transversale, une forme de croissant, avec un côté externe convexe (abaxial) et une surface intérieure concave (adaxiale) (voir Fig. 7.21). Différents gènes s'expriment dans les futures faces adaxiales et abaxiales. Par exemple, le gène *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*) d'arabette, normalement exprimé du côté abaxial du primordium foliaire, est responsable de la spécification du devenir abaxial des cellules. Son expression ectopique dans l'intégralité du primordium foliaire spécifie un devenir abaxial à l'ensemble des cellules et la feuille se développe en une structure cylindrique atrophiée.

La détermination du devenir adaxial des cellules chez l'arabette implique les gènes *PHABULOSA (PHAB), PHAVOLUTA (PHAV)* et *REVOLUTA (REV)*. Ces gènes codent des facteurs de transcription et sont initialement exprimés dans le méristème caulinaire et du côté adaxial des primordia. Les mutations perte de fonction de ces gènes sont à l'origine de feuilles à symétrie radiale avec seulement des cellules de type abaxial caractéristiques de la face ventrale de la feuille. Un microARN (voir Encart 6C) ciblant et détruisant les ARNm de ces gènes sur le côté abaxial est impliqué dans la restriction de l'expression de *PHAB, PHAV* et *REV* au seul côté adaxial.

Il a été suggéré que, chez les plantes sauvages, l'interaction entre les cellules initiales adaxiales et abaxiales au niveau de leur zone de contact soit à l'origine de l'initiation de la croissance latérale permettant la formation du limbe et de l'aplatissement de la feuille. L'importance des frontières dans le contrôle de l'organisation et de la forme a déjà été soulignée lors de l'étude des parasegments de drosophile (voir Section 2.24) et d'autres exemples seront fournis dans le Chapitre 11.

Le développement le long de l'axe proximo-distal de la feuille semble être aussi sous contrôle génétique. Comme chez d'autres herbacées, le primordium foliaire de maïs est constitué, côté tige, du futur tissu de la gaine foliaire, et côté distal, du futur tissu du limbe de la feuille. Des mutations de certains gènes confèrent à des cellules distales une identité proximale, remplaçant, par exemple, le limbe par une gaine. Des mutations affectant l'organisation proximo-distale sont connues aussi chez l'arabette. L'identité régionale le long de l'axe proximo-distal pourrait refléter la dynamique de mise en place des cellules, les cellules distales ayant un devenir différent des cellules proximales du fait de leur maturation plus tardive.

7.12 La disposition régulière des feuilles sur une tige est générée par un transport régulé d'auxine

Au fur et à mesure que la tige grandit, les feuilles sont générées au sein du méristème à des intervalles réguliers, selon un espacement particulier. L'arrangement des feuilles le long de la tige varie selon les espèces et cet arrangement particulier, appelé **phyllotaxie**, découle de l'arrangement des primordia foliaires dans le méristème. À chaque nœud, les feuilles peuvent se former seules, par paires ou en verticilles de trois feuilles ou plus. Les feuilles solitaires sont communément disposées en spirale tout au long de la tige, formant parfois un motif hélicoïdal spectaculaire au sommet de la pousse.

Chez les plantes dont les tiges portent des feuilles en spirale, un nouveau primordium foliaire se forme au centre du premier espace disponible en périphérie de la région centrale du méristème et au-dessus du primordium précédent (voir Fig. 7.21). Cela suggère un mécanisme de mise en place des feuilles fondé sur des inhibitions latérales (voir Section 1.16) dans lequel chaque primordium foliaire inhibe la formation d'une nouvelle feuille sur une certaine distance. Dans ce modèle expérimentalement soutenu, des signaux inhibiteurs issus des primordia foliaires initiés récemment empêchent la mise en place de feuilles trop proches les unes des autres. Chez les fougères, les primordia foliaires sont largement espacés les uns des autres, autorisant



la microchirurgie expérimentale. La destruction du site du prochain primordium destiné à se former entraîne le déplacement vers ce site d'un futur primordium dont la position est la plus proche de lui. (Fig. 7.22). Cependant, des études récentes indiquent que compétition et inhibition sont à l'origine de l'espacement foliaire.

Comme dans le cas de la détermination de la polarité apico-basale de l'embryon, l'auxine est transportée hors des cellules grâce à des protéines telles que PIN1 (voir Section 7.3). Dans la tige, l'auxine produite au niveau de la zone sub-méristématique de l'apex est transportée dans le méristème sus-jacent, à travers l'épiderme et la couche la plus externe du méristème. La direction du flux d'auxine dans l'apex caulinaire est contrôlée par PIN1 et suit une règle simple : la protéine PIN1 est localisée sur la face cellulaire la plus proche de la cellule voisine présentant la plus forte concentration d'auxine. Ainsi, le transport d'auxine s'effectue toujours vers la zone présentant la plus forte concentration. Une forte concentration d'auxine est un activateur de primordium, et au départ, l'auxine est attirée vers un nouveau primordium qui se développe à un site à forte concentration en auxine (Fig. 7.23). Mais ce transport réduit la concentration en auxine dans la zone des cellules entourant le primordium et la concentration en auxine des cellules plus proches du centre du méristème dépasse celle des cellules en position adaxiale du nouveau primordium. Un mécanisme de rétroaction provoque alors la migration de protéines PIN1 sur l'autre face de ces cellules, entraînant alors un flux d'auxine depuis le nouveau primordium vers le méristème, ce qui crée un nouveau site à forte concentration en auxine dans le méristème au niveau de sa partie la plus éloignée de tout nouveau primordium (voir Fig. 7.23).



Fig. 7.23 Le mécanisme de la phyllotaxie dépendant de l'auxine chez l'arabette. L'auxine est transportée par des protéines PIN vers des zones de concentration élevée d'auxine (vert foncé), lieu de formation d'un primordium. Les cellules entourant le primordium en développement viennent à manquer d'auxine (vert clair), ce qui provoque l'inversion de la polarité des protéines PIN et l'auxine s'écoule désormais du primordium vers l'extérieur. Les flèches rouges indiquent la direction de la polarité PIN. Ce schéma de circulation de l'auxine pourrait déterminer le patron normal de la formation des feuilles et des fleurs à partir des méristèmes.

D'après Heisler, M.G., et al. : **Patterns of auxin transport and gene expression during** *primordium development revealed by live imaging of the Arabadopsis inflorescence meristem.* Curr. Biol. 2005, **15** : 1899-1911.

Fig. 7.22 La position *des* primordia foliaires résulte d'une inhibition latérale ou d'une compétition. Les primordia foliaires de l'extrémité de la tige d'une fougère se forment normalement dans l'ordre donné par les positions 1 à 4. Il semble que les nouveaux primordia se forment le plus loin possible des primordia existants, 2 se formant ainsi pratiquement à l'opposé de 1. 4 devrait se former entre 1 et 2, mais si 1 est excisé, 4 apparaît écarté de 2. On peut interpréter ce résultat par la suppression soit d'une inhibition latérale par le primordium 1, soit de la compétition de 1 pour un facteur inducteur de primordium tel que l'auxine.



Fig. 7.24 Structure de l'extrémité racinaire chez l'arabette. Les racines ont une organisation radiaire. Au centre de l'extrémité de la racine en croissance se trouve le futur tissu vasculaire (protoxylème et protophloème). Il est entouré par plusieurs autres couches de tissus.

Fig. 7.25 Carte des territoires présomptifs d'un embryon d'arabette au stade

cordiforme. La racine croît par la division d'un lot de cellules initiales. Le méristème racinaire provient d'un petit ensemble de cellules de l'embryon cordiforme. Chaque tissu de la racine dérive de la division d'une cellule initiale particulière. Au centre du méristème se trouve un centre quiescent, dans lequel les cellules se divisent rarement.

Illustration tirée de Scheres, B., et al. : Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. Development 1994, **120** : 2475-2487. Ce mécanisme conduit à l'établissement de pics séquentiels d'auxine, au niveau des zones où se formeront plus tard des feuilles.

7.13 Les tissus racinaires sont produits par les méristèmes apicaux racinaires d'*Arabidopsis* grâce à un ensemble de divisions cellulaires très stéréotypées

L'organisation des tissus au niveau de l'apex racinaire d'arabette est présentée dans la Fig. 7.24. L'organisation radiaire montre l'épiderme, le cortex, l'endoderme et le péricycle sous forme de monocouches cellulaires, entourant des tissus vasculaires centraux (protoxylème et protophloème). Par de nombreux aspects, les méristèmes apicaux racinaires ressemblent aux méristèmes apicaux caulinaires et l'appareil racinaire est formé de façon comparable à la tige. Mais il existe des différences importantes entre les méristèmes de tige et de racine. Le méristème caulinaire est situé à l'apex de la tige alors que le méristème racinaire est couvert par une coiffe, elle-même issue de l'une des couches du méristème ; de plus, l'apex de la racine ne présente pas d'organisation évidente en segments répétitifs comparables aux modules nœud-entre-nœud-feuille de la tige.

La racine est mise en place précocement (voir Section 7.2) et dès le stade embryonnaire cordiforme, une racine bien organisée peut être mise en évidence au niveau de l'embryon. Une interaction antagoniste entre auxine et cytokinine contrôle la mise en place de la niche des cellules souches de la racine. Une analyse clonale a révélé que le groupe de cellules initiales embryonnaires à l'origine du méristème racinaire de la plantule est issu d'un unique niveau de cellules du stade embryonnaire cordiforme.

Comme le méristème caulinaire, le méristème racinaire est constitué d'un centre organisateur, appelé centre quiescent dans les racines, dont les cellules se divisent très rarement et autour duquel se trouvent des cellules souches comparables aux cellules initiales, à l'origine des tissus racinaires (voir Fig. 7.25). Le centre quiescent est essentiel au fonctionnement du méristème. Quand des parties du méristème sont supprimées par microchirurgie, celui-ci peut régénérer intégralement mais sa régénération passe toujours par la formation préalable d'un nouveau centre quiescent. La destruction au laser de cellules du centre quiescent d'une plante montre que, comme dans le méristème caulinaire, le centre quiescent maintient les cellules initiales situées immédiatement à proximité dans un état de cellules souches et empêche leur différenciation.

Chaque cellule initiale subit un ensemble stéréotypé de divisions cellulaires et donne naissance à un nombre de colonnes ou **files cellulaires** dans la racine en croissance (voir Fig. 7.24) ; chaque file de cellules dans la racine provient donc d'une seule cellule initiale. Certaines cellules initiales donnent naissance à l'endoderme et au cortex alors que d'autres sont à l'origine de l'épiderme et de la coiffe. Avant de quitter le méristème, les cellules indifférenciées issues d'une cellule initiale à l'origine de l'endoderme et du cortex, par exemple, se divisent donc de façon asymétrique pour donner une cellule fille à destinée corticale et une autre qui produira de l'endoderme. Le gène *SCARECROW* est nécessaire à l'asymétrie de ces cellules en division. Les mutants ont des racines dépourvues d'endoderme et de cortex différenciés mais montrent une couche de tissu possédant des caractéristiques mixtes entre les deux.



Cependant, ce patron normal de divisions cellulaires n'est pas immuable. Comme il a été vu plus haut, les mutants *fass* présentant des patrons de divisions cellulaires perturbés, ont une organisation racinaire relativement normale. De plus, l'ablation au laser de cellules méristématiques individuelles n'empêche pas la formation d'une racine normale car un nouveau patron de divisions des cellules initiales restantes permet de remplacer la descendance des cellules détruites. De telles observations montrent que, comme dans le méristème caulinaire, le devenir des cellules dans le méristème racinaire dépend de la reconnaissance de signaux de position et non de leur lignée.

Comme il a été souligné dans la Section 7.3, les gradients d'auxine jouent un rôle majeur dans la mise en place de l'organisation de l'embryon et dans la spécification de la région racinaire. Des mutations affectant la répartition de l'auxine provoquent des malformations racinaires. Au stade embryonnaire globulaire, la protéine transporteuse d'auxine PIN1 est localisée dans les cellules à l'origine de la future région racinaire et le taux maximal d'auxine est présent dans la zone au niveau de laquelle se développera le futur centre quiescent.

Le rôle de l'auxine dans le développement des racines est maintenu dans la plante adulte. L'auxine est transportée hors des cellules racinaires par les protéines PIN et entre dans les cellules voisines. Les cellules à taux d'auxine élevés transportent mieux l'auxine car cette hormone empêche l'endocytose et le recyclage des protéines PIN présentes sur leurs membranes plasmiques. Ainsi, une boucle de rétroaction positive augmente la concentration locale en auxine.

L'auxine joue un rôle clef dans la mise en place de l'organisation de la racine en croissance. La modélisation des mouvements d'auxine d'après la distribution connue des protéines PIN sur les membranes des différents types cellulaires a montré que le flux orienté par ces protéines explique la formation et le maintien d'une concentration d'auxine maximum au niveau du centre quiescent. L'auxine est transportée vers le bas par le tissu vasculaire central de l'apex racinaire, avec une concentration maximale au niveau du centre quiescent, puis vers l'extérieur et vers les parties plus hautes à travers les couches périphériques de l'extrémité de la racine. Ainsi se forment des gradients de concentration le long de l'axe apico-basal et latéralement dans la racine. Cette modé-lisation simule efficacement les effets de tels gradients d'auxine sur les patrons de formation, de différenciation cellulaire et de croissance racinaire en temps réel.

La distribution des quatre facteurs de transcription de la famille PLETHORA dans la racine illustre comment les gradients d'auxine pourraient être traduits en modification du devenir ou du comportement des cellules. Ces facteurs de transcription sont nécessaires au développement normal de la racine et sont exprimés en gradient le long de l'axe apico-basal, avec pour tous, un maximum au niveau du centre quiescent où la concentration en auxine est maximale. Ces facteurs sont ici essentiels au maintien de l'état indifférencié et à la fonction des cellules souches. Des concentrations moins importantes en protéines PLETHORA correspondent à la région méristématique où les cellules prolifèrent et des concentrations encore plus basses semblent nécessaires à la sortie des cellules du méristème et à la différenciation cellulaire dans la zone d'élongation. Bien que cela ne soit pas encore confirmé expérimentalement, l'expression des gènes *PLETHORA* pourrait fournir une lecture du gradient d'auxine qui accompagne directement la mise en place de la racine.

La structuration de la racine dépend également de l'interaction entre auxine et cytokinine. La cytokinine participe à la régulation de la taille du méristème racinaire et à la mise en place de la zone de transition, où les cellules cessent de se diviser et commencent à s'allonger et à se différencier, en réprimant dans cette région le transport d'auxine et les réponses des cellules à cette hormone.

L'auxine est aussi impliquée dans la capacité des plantes à se régénérer à partir d'un petit fragment de tige. En général, des racines se forment au niveau de l'extrémité qui était originellement du côté de la racine, tandis que des tiges feuillées tendent à se développer à partir de bourgeons dormants à l'extrémité qui était du côté tige. Cette régénération polarisée est liée à la différenciation vasculaire et au transport polarisé de l'auxine. Ce transport de l'auxine depuis sa source à l'extrémité de la tige vers la racine conduit à son accumulation à l'extrémité racinaire de la tige coupée, où elle induira la formation de racines. Une hypothèse suggère que la polarité est à la fois induite et exprimée par le flux orienté d'auxine.



Fig. 7.26 Organisation des types cellulaires dans l'épiderme racinaire.

L'épiderme est composé de deux types de cellules : les trichoblastes (T), formant des poils absorbants, et les atrichoblastes (A), qui n'en formeront pas. Les trichoblastes recouvrent la jonction entre deux cellules corticales et les atrichoblastes se localisent au-dessus de la paroi tangentielle extérieure de cellules corticales.

D'après Dolon, L., Scheres, B : **Root pattern : Shooting in the dark ?** Semin. Cell Dev. Biol. 1998, **9 :** 201-206. Un de meilleurs exemples de la circulation intercellulaire d'un facteur de transcription important dans le développement est fourni par les racines. L'expression du gène *SCARECROW*, déjà évoquée, est nécessaire pour que des cellules racinaires acquièrent une destinée endodermique. Cette expression nécessite une activation par le facteur de transcription SHORT-ROOT (SHR). Or SHR n'est pas synthétisé dans les futures cellules endodermiques mais au niveau des cellules adjacentes plus internes. La protéine SHR est transportée depuis ces cellules vers le futur endoderme et ce mouvement semble être régulé plutôt que simplement lié à une diffusion.

7.14 Les poils absorbants sont spécifiés par une combinaison d'informations de position et d'inhibition latérale

Les poils absorbants sont formés à intervalles réguliers autour de la racine par des cellules épidermiques. La régularité de leur disposition résulterait d'une combinaison entre des réponses à des informations de position et une inhibition latérale liée à des échanges intercellulaires de facteurs de transcription. À la surface de la racine en développement, les files de cellules à l'origine des poils absorbants alternent avec des files de cellules qui n'en produiront pas. Si une cellule de l'épiderme est située au-dessus de la zone de contact entre deux cellules corticales adjacentes, elle forme un poil absorbant ; ce ne sera pas le cas si elle n'est en contact qu'avec une seule cellule corticale (Fig. 7.26), ce qui souligne l'importance de la position. De plus, si une cellule change de position par rapport au cortex, son devenir change aussi, passant d'une potentielle cellule formant un poil absorbant à une cellule épidermique classique et vice versa. La plupart des divisions cellulaires au sein du futur épiderme sont horizontales et augmentent le nombre de cellules par files. Cependant, une division anticlinale verticale se produit occasionnellement, repoussant une des cellules filles au sein d'une file adjacente. Cette cellule fille adopte alors un devenir correspondant à sa nouvelle position au regard des cellules corticales adjacentes.

Les signaux de position sont pour l'instant inconnus, mais la protéine SCRAMBLED, une protéine kinase, fait sans doute partie du système de réception de ces signaux par les cellules épidermiques. SCRAMBLED influence l'activité d'un réseau de facteurs de transcription qui contrôlent le devenir des cellules. Deux groupes de facteurs de transcription ont été identifiés par mutations : l'un active la différenciation cellulaire des poils absorbants et l'autre l'inhibe. Un exemple important est WEREWOLF dont l'expression est supprimée par l'activité de SCRAMBLED dans les cellules destinées à former des poils absorbants, vraisemblablement en réponse à un signal de position. Cependant, WEREWOLF est aussi nécessaire à l'expression de facteurs de transcription (CAPRICE, TRYPTYCHON, et ENHANCER OF TRYPTYCHON) indispensables pour la spécification des cellules en poils absorbants. Après la signalisation de position, ces protéines ne seront produites que dans les cellules épidermiques classiques présumées, mais elles se déplaceraient latéralement dans les cellules épidermiques adjacentes et favoriseraient leur différenciation en trichoblastes en inhibant des gènes qui auraient favorisé un devenir non trichoblastique.

RÉSUMÉ

Les méristèmes sont les sites de croissance des plantes. Les méristèmes apicaux, présents à l'extrémité des tiges et des racines, sont à l'origine de tous les organes de la plante : racines, tiges, feuilles et fleurs. Ce sont des petits groupes de quelques centaines de cellules indifférenciées capables de se diviser de façon répétée. Le centre du méristème est occupé par des cellules souches capables de s'auto-renouveler qui remplacent les cellules perdues par le méristème lors de la formation des organes. Le devenir d'une cellule dans le méristème caulinaire dépend de sa position au sein du méristème et d'interactions avec ses cellules voisines, puisqu'une cellule déplacée d'une couche cellulaire à une autre acquiert le devenir associé à sa nouvelle position. Les méristèmes peuvent se reconstituer après destruction partielle, confortant l'idée que des interactions cellules-cellules déterminent le devenir cellulaire. Les cartes des territoires présomptifs des méristèmes caulinaires embryonnaires montrent que ces derniers peuvent être divisés en plusieurs domaines contribuant normalement à la constitution de tissus d'une région particulière de la plante mais le devenir des cellules initiales embryonnaires n'est pas fixé. Le méristème de la tige donne naissance aux feuilles selon un arrangement spatial spécifique, ou phyllotaxie, dont un transport régulé d'auxine semble expliquer au mieux l'origine. Des phénomènes d'inhibition latérale sont impliqués dans l'espacement régulier des poils à la surface des racines ou des feuilles. Dans le méristème racinaire, les cellules sont organisées d'une façon relativement différente du méristème caulinaire et les patrons de divisions cellulaires sont bien plus stéréotypés. Un ensemble de cellules initiales entretient la structure de la racine en se divisant selon des plans variés.



Le développement floral et le contrôle de la floraison

Les fleurs contiennent les cellules reproductrices des angiospermes et se développent à partir du méristème caulinaire. Chez la plupart des plantes, la transition d'un méristème apical caulinaire végétatif en méristème floral produisant des fleurs est largement, voire totalement, sous contrôle de l'environnement, la longueur du jour et les températures étant des facteurs essentiels. Pour une plante comme l'arabette, chez laquelle chaque tige florifère produit de nombreuses fleurs, le méristème caulinaire végétatif se convertit d'abord en méristème inflorescentiel qui formera à son tour des méristèmes floraux, chacun se développant intégralement en une fleur unique (Fig. 7.27). Les méristèmes floraux sont donc déterminés, contrairement au méristème apical caulinaire. Les fleurs, avec l'agencement de leurs organes (sépales, pétales, étamines et carpelles) sont des structures relativement complexes et la compréhension des modalités de leur formation à partir du méristème floral constitue un défi majeur.

La conversion d'un méristème caulinaire végétatif en un méristème à l'origine de fleurs implique l'induction de gènes d'identité méristématique. Un élément régulateur déterminant de l'induction florale chez l'arabette est le gène d'identité du

Fig. 7.27 Micrographie en microscopie électronique à balayage d'un méristème

inflorescentiel d'arabette. Le méristème inflorescentiel central (méristème apical caulinaire, MAC) est entouré par une série de méristèmes floraux (MF) à divers stades de développement. Le méristème inflorescentiel croit indéfiniment. Des divisions cellulaires fournissent de nouvelles cellules à la tige sous-jacente, et de nouveaux méristèmes floraux sur ses flancs. Les méristèmes floraux (ou les primordia de fleurs) se forment un par un selon un patron en spirale. La fleur la plus mature est sur la droite (MF1) et montre l'initiation des primordia de sépales entourant un méristème floral encore indifférencié. Finalement, un tel méristème floral formera aussi des primordia de pétales, d'étamines et de carpelles.

Photographie reproduite avec l'autorisation de Meyerowitz, E.M., et al. : A genetic and molecular model for flower development in Arabidopsis thaliana. Development Suppl. 1991, 157-167. Publié avec l'autorisation de The Company of Biologists Ltd.





Fig. 7.28 Structure de la fleur d'arabette. Les fleurs d'arabette présentent une symétrie radiaire avec un verticille externe de quatre sépales verts identiques, puis quatre pétales blancs entourant un verticille de six étamines, avec deux carpelles au centre. En bas : diagramme floral de la fleur d'arabette représentant une coupe dans le plan indiqué sur le schéma au dessus. Il s'agit d'une représentation conventionnelle de l'arrangement des différentes parties de la fleur, montrant le nombre d'éléments de la fleur dans chaque verticille et leur arrangement les uns par rapport aux autres.

Illustration d'après Coen, E.S., Meyerowitz, E.M. : **The war of the whorls : genetic interactions** controlling flower development. Nature 1991, **353 :** 31-37.

méristème *LEAFY* (*LFY*) ; chez *Antirrhinum*, le gène *FLORICAULA* (*FLO*) assure la même fonction. La façon dont les signaux environnementaux, comme la longueur du jour, influencent l'induction florale est discutée plus bas. Seront considérés auparavant les mécanismes à l'origine du plan d'organisation de la fleur, en particulier ceux qui spécifient l'identité des organes floraux.

7.15 Des gènes homéotiques contrôlent l'identité des organes dans la fleur

Chaque partie de la fleur est générée par un **primordium d'organe floral** produit par le méristème floral. Contrairement aux primordia foliaires tous identiques, les primordia d'organes floraux doivent chacun recevoir une identité correcte et être mis en place selon celle-ci. Une fleur d'arbette est constituée de quatre verticilles de structures concentriques (Fig. 7.28) qui reflètent la disposition des primordia d'organes floraux dans le méristème. Les sépales (verticille 1) se forment sur l'anneau le plus externe des tissus méristématiques et les pétales (verticille 2) à partir d'un anneau de tissu situé en interne par rapport au précédent. Un anneau plus interne encore de tissus donne naissance aux organes reproducteurs mâles, les étamines (verticille 3). La partie centrale du méristème est à l'origine des organes reproducteurs femelles ou carpelles (verticille 4). Un méristème floral d'arabette forme 16 primordia distincts, donnant naissance à une fleur formée de quatre sépales, quatre pétales, six étamines et un pistil constitué de deux carpelles (voir Fig. 7.28).

Les primordia apparaissent à des positions spécifiques dans le méristème, où ils mettront en place une structure caractéristique. Après l'émergence des primordia chez *Antirrhinum*, les lignées cellulaires ne participent plus qu'à certains verticilles, d'une façon relativement comparable à la restriction des lignées cellulaires à des compartiments chez la drosophile (voir Section 2.26). Cette restriction se produit au moment où la forme pentagonale de la fleur devient visible et que les gènes donnant aux différents organes floraux leur identité commencent à s'exprimer. Les compartiments des lignées au sein du méristème floral semblent être délimités par des bandes étroites de cellules ne se divisant pas.

Comme pour les gènes homéotiques spécifiant l'identité des segments chez la drosophile, les mutations des gènes de l'identité florale se traduisent par des mutations homéotiques où une partie de la fleur est remplacée par une autre. Chez le mutant *apetala2* d'arabette par exemple, les sépales sont remplacés par des carpelles et les pétales par des étamines ; chez le mutant *pistillata* les pétales sont remplacés par des sépales et les étamines par des carpelles. Ces mutations ont permis d'identifier les gènes d'identité des organes floraux et de déterminer leur mode d'action.

Les mutations homéotiques florales chez l'arabette peuvent être classées en trois groupes, chacun affectant les organes de deux verticilles adjacents (Fig. 7.29). La première classe de mutations, dont le mutant *apetala2* est un exemple, touche les verticilles 1 et 2, remplaçant les sépales par des carpelles dans le verticille 1 et les pétales par des étamines dans le verticille 2. Le phénotype de la fleur, de l'extérieur vers son centre, est donc carpelle, étamines, étamines, carpelle. La seconde classe affecte les verticilles 2 et 3. Dans ce groupe, les mutants *apetala3* et *pistillata* produisent des sépales à la place des pétales dans le verticille 2 et des carpelles au lieu d'étamines dans le verticille 3 ; le phénotype de la fleur est sépale, sépale, carpelle, carpelle. La troisième classe affecte les verticilles 3 et 4 et donne des pétales à la place des étamines dans le verticille 3 et des sépales ou des structures variables au niveau du verticille 4. Dans ce groupe, le mutant *agamous* présente un ensemble supplémentaire de sépales et de pétales au centre de la fleur, à la place des pièces fertiles mâles et femelles.



Fig. 7.29 Mutations florales homéotiques de l'arabette. À gauche : un mutant *apetala2* a des verticilles de carpelles et d'étamines à la place des sépales et des pétales. Au centre : un mutant *apetala3* a deux verticilles de sépales et deux de carpelles. À droite : des mutants *agamous* ont un verticille de pétales et de sépales à la place des étamines et des carpelles. Les transformations des verticilles sont décrites dans l'encart, et peuvent être comparées aux arrangements chez les fleurs sauvages (voir Fig. 7.28).

Photographies reproduites avec l'autorisation de Meyerowitz, E.M., et al. : **A genetic and molecular model for flower development in Arabidopsis thaliana**. Development Suppl. 1991, 157-167. Au centre d'après Bowman, J.L., et al. : **Genes directing flower development in Arabidopsis**. Plant Cell 1989, **1**: 37-52. Publié avec l'autorisation de The American Society of Plant Physiologists.

Ces phénotypes mutants peuvent être expliqués par un modèle élégant dans lequel des zones superposées d'activité génique spécifient l'identité des organes floraux (Fig. 7.30) d'une manière qui rappelle beaucoup la spécification de l'identité des segments le long du corps chez la drosophile. Cependant, dans le détail, il existe de nombreuses différences et des gènes assez différents sont impliqués. Dans cet exemple, et ce n'est peut-être pas surprenant, les plantes et les animaux ont acquis de manière indépendante, des modalités comparables permettant d'organiser une structure multicellulaire en recrutant pour cela des protéines différentes.

Dans ce modèle, le méristème floral est divisé par les profils d'expression des gènes homéotiques, en trois régions concentriques chevauchantes, A, B et C, qui découpent le méristème en 4 régions non chevauchantes correspondant aux quatre verticilles. Chacune des régions A, B et C correspond au domaine d'action d'une classe de gènes homéotiques et les combinaisons particulières des fonctions de A, B et C donnent à chacun des verticilles une identité unique et ainsi spécifient l'identité de l'organe. Parmi les gènes mentionnés dans la Fig. 7.29, APETALA1 (AP1) et APETALA2 (AP2) sont des gènes de fonction A, APETALA3 (AP3) et PISTILLATA (P1) sont des gènes de fonction B, et AGAMOUS (AG) est un gène de fonction C. L'expression de AP3 et AG dans la fleur en développement est montrée dans la Fig. 7.31. Tous les gènes homéotiques, ou gènes d'identité d'organes floraux, codent des facteurs de transcription et les protéines de fonction B et C, comme AP3 et AG, contiennent une séquence conservée de liaison à l'ADN, le domaine MADS. Les gènes à boîte MADS sont présents chez les animaux et la levure mais leur implication dans le développement est surtout connue chez les plantes - même si le facteur de transcription à domaine MADS, MEF2, est impliqué dans la différenciation musculaire chez les animaux. Le modèle originel de spécification de l'identité des organes floraux est présenté en détail dans





Fig. 7.30 Les trois régions du méristème floral d'arabette se recouvrent en partie et ont été identifiées par les mutations homéotiques de l'identité florale. La région A correspond aux anneaux 1 and 2, B aux anneaux 2 et 3, et C aux anneaux 3 et 4.

Fig. 7.31 Expression d'*APETALA3* et d'*AGAMOUS* pendant le développement de la fleur. L'hybridation *in situ* montre que (à gauche) *AGAMOUS* s'exprime dans les anneaux centraux, alors que (à droite) *APETALA3* s'exprime dans les anneaux extérieurs qui donnent naissance aux pétales et aux étamines.

Reproduit avec l'autorisation de Meyerowitz. **The Genetics of Flower Development**. Scientific American 1994.

ENCART 7C Le modèle de base de la mise en place de l'organisation de la fleur d'Arabidopsis



Figure 1

Le méristème floral est divisé en trois régions partiellement chevauchantes A, B et C, chaque région correspondant à une classe de mutations homéotiques (voir Fig. 7.29 et texte). Trois fonctions régulatrices, *a*, *b* et *c*, sont actives respectivement dans les régions A, B et C (voir Figure 1). Dans la fleur sauvage (Figure 1, partie de gauche), on considère que la fonction *a* est exprimée dans les verticilles 1 et 2, *b* dans les verticilles 2 et 3, et *c* dans les verticilles 3 et 4. De plus, la fonction *a* inhibe la fonction *c* dans les verticilles 1 et 2 et la fonction *c* inhibe la fonction *a* dans les verticilles 3 et 4, autrement dit, les fonctions *a* et *c* sont mutuellement exclusives. La fonction *a* seule spécifie les sépales, *a* et *b* ensemble spécifient les pétales, *b* et *c* les étamines et *c* seule les carpelles.

Les mutations homéotiques éliminent les fonctions *a*, *b* ou *c* et altèrent, les régions du méristème dans lesquelles ces fonctions sont exprimées. Les mutations de la fonction *a*, comme *apetala2* (voir Figure 1, au centre) provoquent sa disparition et l'expression de la fonction c dans tout le méristème, d'où la mise en place d'un patron de moitié de fleur : carpelle, étamine, étamine, carpelle. Les mutations affectant la fonction *b*, comme *apetala3* (voir Fig. 7.29), permettent l'expression de la fonction *a* seule dans les verticilles 1 et 2 et de la fonction *c* seule dans les verticilles 3 et 4, donnant un phénotype sépale, sépale, carpelle, carpelle. Les mutations de fonctions *c* (comme *agamous*) conduisent à l'expression de *a* dans tous les verticilles, à l'origine du phénotype sépale, pétale, pétale, sépale (voir Figure 1, à droite).

Ce modèle permet de rendre compte de façon satisfaisante de tous les mutants homéotiques floraux connus jusqu'ici chez l'arabette (même s'il existe des variations du nombre de gènes et de leurs patrons d'expression chez d'autres espèces conduisant à des phénotypes mutants inconnus chez l'arabette), et des gènes spécifiques peuvent être assignés à chaque fonction de contrôle. La fonction *a* correspond à l'activité de gènes comme *APETALA2*, *b* à *APETALA3* et *PISTILLATA*, et *c* à *AGAMOUS*. Le modèle intègre aussi le phénotype de doubles mutants, comme *apetala2/apetala3* ou *apetala3/pistillata* (voir Figure 2).

Ce système souligne la similarité de fonctions entre les gènes homéotiques des animaux et ceux contrôlant l'identité



Figure 2

des organes floraux, bien que les gènes eux-mêmes soient totalement différents. La similarité fonctionnelle avec le complexe HOM-C de drosophile est également illustrée par le rôle du gène *CURLY LEAF* d'arabette, nécessaire à la répression stable d'un gène homéotique floral. *CURLY LEAF* est proche de la famille de gènes animaux *Polycomb* qui sont, de façon similaire, nécessaires à la répression stable de gènes homéotiques chez la drosophile et les mammifères. l'Encart 7C. Ce modèle simple a été depuis complété en termes d'activités et de fonctions des gènes identifiés par les mutations homéotiques, et de nombre de gènes et de fonctions impliqués dans le contrôle du développement floral.

Lors des tests expérimentaux du modèle de l'identité des organes floraux, il a été montré que les gènes ABC exprimaient leurs propriétés homéotiques dans les méristèmes floraux mais ne permettaient pas la conversion de feuilles en organes floraux quand ils étaient surexprimés artificiellement dans les méristèmes végétatifs, ce qui était pourtant attendu pour des gènes homéotiques de ce type. Cette question a permis la découverte des gènes *SEPALLATA* (*SEP*), codant eux aussi des protéines à domaine MADS. Ces gènes nécessaires pour les fonctions *b* et *c* sont seulement actifs dans les méristèmes floraux. On pense que les protéines SEP s'associent avec les produits des gènes *B* et *C* pour former des complexes actifs de régulation de l'expression de gènes. La Fig. 7.32 illustre le modèle actuel de ce mécanisme à l'origine de la spécification de l'identité des organes floraux.

Les fonctions et les patrons d'expression des gènes homéotiques sont mieux compris aujourd'hui que lorsque le modèle ABC a été proposé pour la première fois. Un rôle double de AP1, gène homéotique à boîte MADS de classe A, a été mis en évidence : agissant précocement avec d'autres gènes pour spécifier l'identité générale du méristème floral, il contribue ensuite à la fonction *a*. L'expression de *AP1*, induite par le gène d'identité méristématique LFY exprimé dans l'intégralité du méristème, est activement réprimée dans la région centrale des méristèmes floraux par AGAMOUS. La concentration de la protéine AP2 reste faible car l'expression du gène de classe A APETALA2 (AP2) est réprimée au niveau traductionnel par un microARN. Les activations de APETALA3 et PISTILLATA1 seraient liées au gène d'identité méristématique UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO), qui est exprimé dans le méristème selon un patron comparable à celui des gènes de fonction b (voir Fig. 7.32). UFO code un constituant de l'ubiquitine ligase, et exercerait son effet sur le développement floral en ciblant des protéines spécifiques à dégrader. L'étude du contrôle de la dégradation de la β -caténine chez les animaux (voir Chapitres 4 et 6) a démontré que la dégradation régulée des protéines peut être un mécanisme efficace dans le développement. Dans le centre du méristème floral, l'expression de AGAMOUS est partiellement contrôlée par WUS qui est exprimé dans le centre organisateur du méristème caulinaire végétatif et continue de s'exprimer dans les méristèmes floraux.

Un autre groupe de gènes, contrôlant les divisions cellulaires, participe à l'organisation des primordia d'organes floraux. Par exemple, le gène *SUPERMAN* contrôle la prolifération cellulaire dans les primordia à l'origine des étamines et des carpelles, ainsi que dans les ovules. Les plantes mutantes pour ce gène ont des étamines à la place des carpelles au niveau du quatrième verticille. *SUPERMAN* s'exprime dans le troisième verticille et maintient la frontière entre les troisième et quatrième verticilles.

Bien que les fleurs des différentes espèces d'angiosperme soit extrêmement variées, les mécanismes du développement floral semblent être très similaires. Par exemple, les gènes contrôlant le développement floral chez *Antirrhinum* présentent des similarités frappantes avec ceux de l'arabette, malgré une morphologie finale bien différente de la fleur du muflier (ou gueule-de-loup). Lorsque l'on compare les patrons d'activité des gènes équivalents dans les fleurs d'arabette en développement, on retrouve les restrictions de lignées cellulaires aux verticilles observées chez *Antirrhinum*.

7.16 La fleur d'Antirrhinum présente une organisation dorso-ventrale et radiaire

Comme les fleurs d'arabette, les fleurs d'*Antirrhinum* sont organisées en quatre verticilles mais, contrairement à *Arabidopsis*, elles possèdent cinq sépales, cinq pétales, quatre étamines et deux carpelles (Fig. 7.33, gauche). Des mutations homéotiques florales comparables à celles d'*Arabidopsis* existent chez Antirrhinum et l'identité des organes floraux est spécifiée de la même façon. Plusieurs gènes homéotiques d'*Antirrhinum* sont homologues de ceux d'arabette, la boîte MADS étant, en particulier, bien conservée.

Des mécanismes supplémentaires sont nécessaires pour la mise en place de l'organisation florale chez *Antirrhinum* qui montre une symétrie bilatérale en plus de l'organisation radiaire commune à toutes les fleurs. Dans le verticille 2, les lobes des deux pétales supérieurs présentent une forme différente des trois autres, donnant à la fleur son allure de gueule-de-loup caractéristique. Au niveau du verticille 3, l'étamine



Fig. 7.32 État actuel du modèle ABC d'identité des organes floraux. Les gènes régulateurs *LEAFY*, *WUSCHEL* (*WUS*), et *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) s'expriment dans des domaines spécifiques du méristème floral, ce qui, avec la répression d'*APETALA1* par *AGAMOUS*, détermine le patron des fonctions ABC. Les protéines ABC et les co-facteurs protéiques SEP s'assemblent en complexes qui spécifient les identités des différents organes.

D'après Lohmann, J.U., Weigel, D. : Building beauty : the genetic control of floral patterning. Dev. Cell 2002, 2 : 135-142.

Fig. 7.33 Les mutations de CYCLOIDEA rendent la fleur d'Antirrhinum symétrique.

Chez la fleur sauvage (à gauche) le patron des pétales diffère le long de l'axe dorsoventral. Chez le mutant (à droite) la fleur est symétrique. Tous les pétales sont identiques au pétale le plus ventral de la fleur sauvage et sont repliés vers l'intérieur.

Photographie reproduite avec l'autorisation de Coen, E.S., Meyerowitz, E.M. : **The war** of the whorls : genetic interactions controlling flower development. Nature 1991, **353** : 31-37. © 1991 Macmillan Magazines Ltd.



Fig. 7.34 Méristème floral. Le méristème est composé des couches L1, L2 et L3. Les cellules du centre sont dérivées de L3. Les primordia des sépales viennent de commencer à se développer.

Illustration tirée de Drews, G.N., Goldberg, R.B. : Genetic control of flower development. Trends Genet. 1989, 5 : 256-261.



Fig. 7.35 Nombre d'organes floraux de plants de tomates chimères sauvage/ fasciated. Chez le mutant *fasciated*, la fleur présente des organes en surnombre. Pour les chimères chez lesquelles seule la couche L3 du méristème floral contient des cellules mutantes, le nombre d'organes par fleur est encore augmenté, ce qui montre que L3 peut contrôler le comportement des cellules dans les couches externes du méristème.



la plus haute est absente, l'avortement de son développement étant très précoce. La fleur d'*Antirrhinum* présente donc un axe dorso-ventral visible. Un autre groupe de gènes homéotiques, distincts de ceux contrôlant l'identité des organes floraux semble intervenir dans la mise en place de cette organisation dorso-ventrale. Par exemple, des mutations dans le gène *CYCLOIDEA*, exprimé dans la région dorsale, abolissent la polarité dorso-ventrale et sont à l'origine de fleurs présentant une symétrie proche d'une symétrie radiaire (Fig. 7.33, à droite).

7.17 La couche interne du méristème peut spécifier la mise en place du méristème floral

Bien que les trois couches d'un méristème floral (Fig. 7.34) soient impliquées dans l'organogenèse, la contribution des cellules de chaque couche à une structure particulière peut être variable. Des cellules d'une couche peuvent s'intégrer à une autre sans perturber la morphologie, suggérant que la position d'une cellule au sein du méristème est le principal déterminant de son comportement futur. Des chimères périclinales (voir Section 7.8) construites à partir de cellules de différents génotypes et qui sont à l'origine de différents types de fleurs permettent d'obtenir des informations sur la signalisation de position et la mise en place de l'organisation au sein du méristème floral. De telles chimères permettent de savoir si le comportement d'une cellule est contrôlé de façon autonome selon son génotype ou par des signaux issus d'autres cellules.

Les chimères peuvent être générées par mutation, mais aussi par greffes entre deux plantes de génotypes différents. Un nouveau méristème caulinaire peut se former à la jonction de la greffe et parfois il contient des cellules des deux génotypes. De telles chimères peuvent être réalisées entre des plants sauvages de tomate et des plants de tomate portant la mutation *fasciated*, chez lesquels la fleur comporte à chaque verticille des organes floraux surnuméraires. Des chimères dans lesquelles seule la couche L3 contient des cellules *fascinated* présentent aussi ce phénotype (Fig. 7.35). Ces organes floraux plus nombreux sont associés à une augmentation générale de la taille du méristème floral qui n'est obtenue chez les plantes chimériques que si les cellules *fasciated* de la couche L3 induisent des divisions à un rythme plus soutenu que le rythme normal des cellules de la couche L1. Le mécanisme de la signalisation entre les cellules des couches L3 et L1 n'est pas encore connu. Chez *Antirrhinum*, l'expression anormale de *FLORICAULA* dans une seule couche du méristème peut conduire au développement floral. Ces résultats illustrent l'importance de la signalisation entre les différentes couches cellulaires au cours du développement floral.

7.18 La transition du méristème caulinaire de l'état végétatif à l'état floral est sous contrôle génétique et environnemental

Les plantes à fleurs présentent d'abord une croissance végétative au cours de laquelle le méristème apical génère des feuilles. Sous l'influence de signaux environnementaux comme l'augmentation de la durée du jour, la plante passe ensuite à une phase reproductrice et, dès lors, le méristème apical donne naissance uniquement à des fleurs. Il existe deux grands types de transition de l'état de croissance végétative à la reproduction. Dans le type déterminé, le méristème inflorescentiel est à l'origine d'une fleur terminale tandis que dans le type indéterminé, le méristème inflorescentiel donne naissance à un certain nombre de méristèmes floraux. L'arabette est de type indéterminé (Fig. 7.36). La première réponse aux signaux d'induction florale chez l'arabette est l'expression de gènes d'identité de méristèmes floraux comme LEAFY et le gène à double fonction AP1 (voir Section 7.15), qui sont nécessaires et suffisants pour cette transition. LEAFY active AP1 dans tout le méristème mais active aussi AGAMOUS au centre de la fleur. AGAMOUS réprime alors l'expression d'AP1 au centre du méristème et restreint donc sa fonction de gène d'identité d'organe floral à la seule région A (voir Fig. 7.32). Des mutations de gènes d'identité du méristème floral transforment partiellement les fleurs en tiges. Chez un mutant *leafy*, les fleurs sont transformées en spirales d'organes comparables à des sépales le long de la tige. À l'inverse, l'expression de LEAFY dans l'intégralité de la plante est suffisante pour conférer une destinée florale aux méristèmes caulinaires axillaires et leur transformation en fleurs (Fig. 7.36, en bas).

Chez l'arabette, la floraison est favorisée par l'augmentation de la longueur du jour qui annonce la fin de l'hiver et le début du printemps (voir Fig. 7.36). Cette réponse est le photopériodisme. Chez certaines variétés, la floraison est aussi accélérée après une exposition longue de la plante à des températures froides, qui constitue un signal de la fin de l'hiver. Ce phénomène est appelé vernalisation. Des expériences de greffes ont montré que la longueur du jour est détectée non par le méristème lui-même mais par les feuilles. Quand la durée de lumière continue atteint une certaine valeur, un signal diffusible d'induction florale est produit et transmis via le phloème au méristème caulinaire. La voie déclenchant la floraison implique l'horloge circadienne de la plante, un minuteur interne sur 24 heures à l'origine des variations de nombreux processus métaboliques et physiologiques, y compris l'expression de certains gènes, au cours de la journée. Un des gènes régulés par l'horloge circadienne est CONSTANS (CO), qui est un gène clef dans le contrôle de la mise en place de la floraison et qui fait le lien entre mécanisme de détection de la longueur du jour et production du signal de floraison. L'expression de CO oscille selon un cycle de 24 h sous le contrôle de l'horloge circadienne, avec un pic d'expression vers la fin de l'après-midi. En jours longs, ce pic d'expression a lieu à la lumière alors qu'en jours plus courts, il fait déjà nuit au moment du pic d'expression. Or dans le noir, la protéine CO est dégradée. Le contrôle circadien permet donc l'accumulation de CO à des concentrations suffisamment importantes pour déclencher l'initiation de la floraison uniquement lorsque les conditions lumineuses sont favorables (Fig. 7.37).

CO est un facteur de transcription activant le gène *FLOWERING LOCUS T (FT)*, à l'origine de la protéine FT qui semble agir en tant que signal de floraison. Depuis la feuille, la protéine FT atteindrait, *via* le phloème, le méristème apical caulinaire au niveau duquel elle forme un complexe actif avec FLOWERING LOCUS D (FD), un

Fig. 7.37 L'initiation de la floraison est sous le double contrôle de la durée du jour et de l'horloge circadienne. Le facteur de transcription CONSTANS (CO), requis pour la production du signal de floraison, est produit dans les feuilles sous le contrôle de l'horloge circadienne. Quand les jours sont courts, le pic d'expression du gène *CO* se produit à l'obscurité et la protéine est rapidement dégradée. Quand les jours sont longs, l'expression maximale a lieu à la lumière et la protéine CO s'accumule.





Fig. 7.38 Signaux initiant la floraison

chez l'arabette. Quand la durée du jour s'allonge après l'hiver, le facteur de transcription CO s'accumule dans la feuille et provoque l'activation de *FT* dans les cellules du phloème foliaire. La protéine FT est transportée par le phloème vers l'apex caulinaire où elle interagit avec le facteur de transcription FD pour former un complexe agissant avec le facteur LEAFY (dont la propre expression est régulée positivement dans l'apex caulinaire par FT) pour activer des gènes clés de l'identité du méristème floral comme *AP1*, qui convertit le méristème végétatif en méristème produisant des méristèmes floraux.

Illustration d'après Blazquez, M.A. : **The right time and place for making flowers**. Science 2005, **309**: 1024-1025.



facteur de transcription exprimé dans le méristème, et active l'expression de gènes de floraison tels que *AP1* (Fig. 7.38). L'activation de *FT* dans une seule feuille est suffisante pour induire la floraison. L'induction de la floraison nécessite aussi la régulation négative d'un ensemble de gènes réprimant la formation des fleurs comme *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Ceux-ci répriment la transition d'un méristème végétatif à l'état floral jusqu'à ce que des signaux positifs de floraison soient perçus. FLC code une protéine qui se lie à FT et réprime son activité. Après l'exposition au froid, par exemple, l'activité de FLC est faible et la répression de FT peut être levée.

7.19 La plupart des plantes à fleurs sont hermaphrodites mais certaines produisent des fleurs unisexuées

Contrairement aux animaux, les plantes ne réservent pas de cellules germinales au sein de l'embryon. Les cellules reproductrices sont seulement spécifiées lors du développement de la fleur. N'importe quelle cellule méristématique peut, en principe, donner naissance aux cellules reproductrices de l'un ou l'autre sexe et il n'existe pas de chromosomes sexuels. La plupart des plantes à fleurs (angiospermes) donne naissance à des fleurs abritant à la fois les organes sexuels mâles et femelles, au sein desquels la méiose a lieu. Les organes sexuels mâles sont les étamines ; elles produisent le pollen qui contient les noyaux spermatiques correspondant aux spermatozoïdes des animaux. Les structures reproductives femelles ou carpelles sont soit libres entre eux, soit fusionnés en un seul ovaire. Les carpelles sont le lieu de la formation des ovules, chaque ovule produisant, dans une structure appelée sac embryonnaire, le gamète femelle.

Chez les angiospermes, comme l'arabette, la fécondation est double. Chaque grain de pollen contient deux noyaux spermatiques qui sont transportés jusqu'à l'ovule grâce à la croissance d'un tube pollinique les abritant. Un noyau mâle fusionne avec le gamète femelle haploïde proprement dit, appelé oosphère et cette fécondation est à l'origine du zygote principal qui se développera en embryon. Le second noyau mâle fusionne avec la cellule centrale diploïde du sac embryonnaire de l'ovule, formant une cellule triploïde qui proliférera et donnera un tissu de réserve, l'albumen. Chez certaines plantes, comme l'arabette, l'albumen alimente l'embryon pendant sa croissance, tandis que chez d'autres espèces, il est mobilisé lors de la germination pour permettre l'alimentation de la plantule.

La plupart des plantes à fleurs sont hermaphrodites, arborant des fleurs avec des organes sexuels mâles et femelles, comme c'est le cas pour l'arabette. Mais 10 % des espèces de plantes à fleurs produisent des fleurs unisexuées. Les fleurs des deux sexes
peuvent se trouver sur la même plante ou être présentes sur des pieds différents. Le développement de fleurs mâles ou femelles implique habituellement la résorption sélective des étamines ou du pistil après leur spécification et le début de leur croissance. Chez le maïs par exemple, les fleurs mâles et femelles se développent à des endroits différents de la tige. La panicule sommitale de la tige principale porte seulement des fleurs staminées (mâles) ; les épis situés à l'extrémité des branches latérales portent des fleurs pistillées (femelles). La détermination du sexe est visible très précocement ; les primordia des étamines sont plus gros dans les fleurs mâles et les primordia des carpelles plus longs dans les fleurs femelles. Finalement, les organes sexuels plus petits dégénèrent. L'acide gibbérellique serait impliqué dans la détermination du sexe, car les concentrations de cette hormone végétale sont différentes en fonction des organes sexuels. La concentration en gibbérelline de la panicule de maïs est 100 fois plus faible que dans les épis en développement. Si la concentration en acide gibbérellique est augmentée dans la panicule, des pistils peuvent s'y développer.

L'empreinte génomique (voir Section 10.8) existe chez les plantes à fleurs mais a seulement été détectée dans l'albumen et non dans l'embryon. Elle concerne le génome de la cellule centrale et le génome des noyaux spermatiques. Chez les plantes, comme chez les mammifères, l'empreinte implique l'extinction de gènes par méthylation de l'ADN, modifications des histones, implication de protéines Polycomb et d'ARN non codants. Contrairement aux mammifères cependant, produire une nouvelle génération n'implique pas que l'empreinte soit effacée, puisque l'albumen est un tissu temporaire qui ne contribue pas à la formation des cellules de l'embryon. Outre l'extinction de gènes paternels des noyaux spermatiques par méthylation de l'ADN et modifications des histones, une caractéristique de l'empreinte chez les angiospermes est la déméthylation de l'ADN de gènes maternels initialement éteints au niveau de la cellule centrale, permettant ainsi leur expression. Parmi ces gènes activés se trouvent de nombreux membres du groupe Polycomb, qui maintiennent alors la répression d'allèles paternels et éteignent des allèles maternels d'autres gènes. L'empreinte chez les angiospermes pourrait avoir évolué avec la double fécondation comme un moyen d'empêcher le développement de l'albumen en absence de la fécondation.

RÉSUMÉ

Avant la floraison, déclenchée par des conditions environnementales comme la longueur du jour, le méristème apical caulinaire végétatif se convertit en un méristème inflorescentiel qui donnera une fleur ou produira un ensemble de méristèmes floraux, chacun conduisant à la formation d'une seule fleur. Des gènes impliqués dans l'initiation de la floraison et dans la mise en place de la fleur ont été identifiés à la fois chez l'arabette et Antirrhinum. La floraison est induite par la longueur du jour interagissant avec le rythme circadien naturel d'expression de gènes de la plante et permettant l'activation, dans les feuilles, d'un gène à l'origine d'un signal de floraison transporté ensuite jusqu'au méristème caulinaire. Ce signal active l'expression de gènes d'identité du méristème, nécessaire pour la conversion du méristème caulinaire végétatif en un méristème inflorescentiel et la formation de méristèmes floraux à partir du méristème inflorescentiel. Des gènes homéotiques d'identité des organes floraux, qui spécifient les types d'organes présents dans les fleurs, ont été identifiés à partir de mutations transformant certaines parties de la fleur en d'autres parties. L'analyse de ces mutations, a permis de proposer un modèle selon lequel le méristème floral est divisé en trois régions concentriques partiellement chevauchantes au sein desquelles une combinatoire de certains gènes d'identité florale agit et spécifie le type d'organe de chaque verticille. Des études exploitant des plantes chimériques ont montré que les différentes couches des méristèmes communiquent entre elles durant le développement floral et que des facteurs de transcription peuvent passer de cellules à cellules. Contrairement aux animaux, les plantes ne mettent pas de cellules germinales en réserve dès l'embryon et les cellules reproductrices sont seulement spécifiées quand la fleur se développe. Des empreintes génomiques sont mises en place chez les plantes à fleurs, apparemment limitées à l'albumen.



Résumé du chapitre 7

- Le développement des plantes présente des caractéristiques propres liées à la présence de parois rigides et à l'absence de migrations cellulaires.
- Contrairement aux animaux, une cellule somatique isolée d'une plante peut régénérer une nouvelle plante entière.
- Le développement embryonnaire précoce est caractérisé par une division cellulaire asymétrique du zygote principal spécifiant les futures régions apicale et basale.
- Au cours du développement précoce des plantes à fleurs, divisions asymétriques et interactions cellule-cellule sont impliquées dans la mise en place du plan d'organisation. Au cours de ce processus, les méristèmes caulinaire et racinaire sont spécifiés et ces derniers donnent naissance à l'ensemble des organes de la plante, tiges, feuilles, fleurs et racines.
- Le méristème apical donne naissance aux feuilles dans des positions bien définies au cours d'un processus impliquant le transport régulé d'un morphogène : l'auxine.
- Le méristème caulinaire peut être converti en un méristème inflorescentiel qui pourra soit devenir un méristème floral (dans les inflorescences déterminées) soit donner naissance à une série de méristèmes floraux, conservant ainsi indéfiniment son identité méristématique (dans les inflorescences indéfinies).
- Dans les méristèmes floraux, qui donnent chacun naissance à une fleur, des gènes homéotiques d'identité des organes floraux agissent de façon combinatoire pour spécifier l'identité des différents organes floraux.
- L'augmentation de la durée du jour induit la synthèse d'un signal florigène dans les feuilles qui est transporté vers le méristème caulinaire où il induit la formation d'une fleur.
- Contrairement aux animaux, les plantes ne mettent pas à part des cellules germinales dans leur embryon et les cellules reproductrices sont spécifiées seulement lors du développement floral. Des empreintes génomiques sont mises en place chez les plantes à fleurs, mais sont apparemment limitées à l'albumen.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Quelles caractéristiques ont conduit à adopter *Arabidopsis thaliana* comme principale plante modèle pour l'étude du développement des plantes ?

2. Quelles sont les particularités caractéristiques de ces différentes parties d'une plante : tige, racine, nœud, feuille, méristème, sépale, pétale, étamine, carpelle ?

3. Au cours de l'embryogenèse chez l'arabette, quel est le rôle de l'auxine avant le stade 32 cellules ? Quel mécanisme génère des concentrations différentielles d'auxine ? Par quel mécanisme les auxines influencent-elles l'expression des gènes ?

4. Décrire le processus de production d'une plante transgénique. Inclure le rôle du plasmide Ti et d'*Agrobacterium tumefaciens*.

5. Qu'est ce qu'un méristème ? Décrire la structure du méristème caulinaire d'arabette.

6. Comparer les rôles des gènes à homéoboîtes *WUSCHEL (WUS)* et *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* dans la formation et l'entretien des méristèmes caulinaires.

7. Qu'ont révélé les études de chimères mériclinales sur la spécification des cellules au cours de l'embryogenèse des plantes ? Les cellules sont-elles spécifiées dans l'embryon pour former des feuilles et des fleurs, de façon comparable, par exemple, aux cellules du mésoderme dorsal des embryons animaux ?

8. Orienter une feuille, en référence à l'axe radiaire de la tige. Comment est obtenue la restriction des facteurs de transcription PHAB, PHAV et REV au niveau de la surface supérieure de la feuille ? 9. Comment l'auxine contrôle-t-elle la position des primordia foliaires ? Inclure le rôle des transporteurs PIN et le concept d'inhibition latérale dans votre réponse.

10. À quoi correspond SHORT-ROOT ? Comment expliquer sa présence dans les cellules de l'endoderme ? Les plasmodesmes sont-ils impliqués ? Existe-t-il un processus analogue impliquant le gène KNOTTED-1 du maïs, orthologue de SHOOT MERISTEMLESS ?

11. Quelle est la nature des mutations homéotiques connues chez l'arabette ? Quels sont les gènes impliqués ?

12. Expliquer le modèle ABC du développement floral. Comment illustre-t-il le contrôle combinatoire de l'identité cellulaire ?

13. Le domaine MADS a été nommé à partir de protéines au sein desquelles il avait été initialement détecté : MCM1 (Saccharomyces), AGAMOUS (Arabidopsis), DEFICIENS (Antirrhinum) et SRF (Homo). Quelle est la fonction d'un domaine MADS dans une protéine ? (Noter que ces protéines ne sont pas apparentées aux SMADS ; voir Fig. 4.33.)

14. Quelle modification du modèle ABC issu d'études chez l'arabette est nécessaire pour expliquer le développement floral chez Antirrhinum ?

15. Par quel mécanisme la photopériode permet-elle de déclencher le développement floral chez Arabidopsis ?

0CM

NB. Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées

1. Combien de gènes sont présents respectivement chez l'être humain, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, et Arabidopsis. (Bien que le nombre de gènes chez l'espèce humaine n'ait pas encore été donné dans le texte, celui des autres organismes a été précisé).

- a) 19 000 27 000 14 000 19 000
- b) 21 000 14 000 19 000 27 000
- c) 27 000 21 000 19 000 14 000
- d) 14 000 19 000 21 000 27 000
- **2.** Chez les plantes, l'embryogenèse a lieu
- a) dans l'ovule, après que la graine a été fécondée et libérée par la plante
- b) dans la graine, après la germination
- c) dans la graine, après la fécondation
- d) dans l'ovule, avant que la graine ne soit libérée par la plante

3. Quelle affirmation concernant sur la totipotence des cellules est correcte ?

- a) Toutes les cellules animales et végétales sont totipotentes.
- b) Chez les plantes, beaucoup de cellules sont totipotentes, alors que chez les animaux, seul l'œuf fécondé est totipotent.
- c) Chez les mammifères, les cellules embryonnaires sont totipotentes.
- d) Seules les cellules souches des animaux et les cellules méristématiques des plantes sont totipotentes.

4. Un des premiers événements dans le développement de l'arabette est la formation de l'axe _____, en réponse à un gradient de

- a) adaxial-abaxial, cytokinines
- b) apical-basal, auxine
- c) apical-basal, protéines Pin
- d) dorsal-ventral, miARN

- 5. La carte des territoires présomptifs de l'embryon d'Arabidopsis au stade cordiforme indique que
- a) bien qu'aucune des structures adultes ne soit encore formée, on peut déjà identifier les régions qui vont former des méristèmes, qui deviendront ensuite des structures adultes.
- b) le développement chez les plantes est tellement indéterminé qu'on ne peut pas tracer de véritable carte des territoires présomptifs.
- c) les primordia des feuilles, des tiges et des racines ont déjà été formés.
- d) les trois feuillets embryonnaires qui vont donner naissance aux racines, aux tiges et aux feuilles ont été formés.
- **6.** La mutation *agamous* cause la formation de
- a) fleurs avant seulement des pétales et des sépales
- b) fleurs ayant seulement des sépales et des carpelles
- c) fleurs ayant seulement des étamines et des carpelles
- d) plantes totalement dépourvues de fleurs

7. Sur lequel des mécanismes suivants repose l'entretien des méristèmes de tiges et de racines des plants d'arabette adultes ?

- a) Un facteur de transcription à homéodomaine codé par le gène WUSCHEL assemblé dans le centre organisateur est à l'origine d'un signal aux cellules supérieures de se comporter comme des cellules souches.
- b) Un facteur de transcription codé par le gène SHOOT MERISTEMLESS est assemblé dans les cellules des méristèmes apicaux et les maintient dans leur état indifférencié.
- c) Les cellules des méristèmes apicaux sécrètent des protéines codées par la famille de gènes CLAVATA qui inhibent l'expression de WUSCHEL, restreignant ainsi la taille des méristèmes apicaux.
- d) Tous ces mécanismes sont impliqués dans la spécification et l'entretien des méristèmes apicaux.

8. Que signifie le mot "verticille" à propos des méristèmes floraux ?

- a) Les fleurs comportent plusieurs types d'organes, organisés en anneaux concentriques appelés "verticilles".
- b) La formation des fleurs nécessite une rotation du méristème floral, donnant lieu à un processus qualifié de "verticille".
- c) Lors de l'élongation de la tige, les fleurs d'arabette apparaissent selon un patron appelé "verticille".
- d) Les six étamines d'une fleur de dicotylédone comme l'arabette forment un anneau qui est nommé le "verticille" de la fleur.

9. En quoi les gènes homéotiques des plantes à fleurs sont-ils similaires à ceux de la drosophile et d'autres animaux ?

- a) Tous les gènes homéotiques codent des facteurs de transcription à homéoboîte.
- b) Les gènes homéotiques des plantes et des animaux codent des facteurs de transcription à domaine MADS.
- c) Les mutations des gènes homéotiques des fleurs entraînent la transformation d'un organe en un autre.
- d) Au cours de l'évolution, les gènes homéotiques des fleurs ont dérivé des mêmes gènes primordiaux que ceux utilisés chez les animaux.

10. En quoi le modèle ABC de l'identité florale chez l'arabette rappelle-t-il les modèles de la fonction des gènes homéotiques dérivés des études chez la drosophile ?

- a) Chez les deux organismes, chaque gène à homéoboîte spécifie l'identité d'une région différente de l'adulte.
- b) Chez les deux organismes, un gène homéotique s'exprime aux deux extrémités, un deuxième gène s'exprime dans un domaine plus central et un troisième essentiellement au centre, contribuant ainsi à identifier de façon non ambiguë toutes les régions de l'organisme.
- c) Chez les deux organismes, c'est souvent la combinaison des gènes en présence qui permet la spécification non ambiguë des structures de l'adulte.
- d) Le rôle fondamental des gènes homéotiques chez les deux organismes est la structuration de l'identité antéro-postérieure.

Réponses aux QCM

1 : b, 2 : d, 3 : b, 4 : b, 5 : a, 6 : a, 7 : d, 8 : a, 9 : c, 10 : c.

Références bibliographiques générales

- Meyerowitz, E.M. : *Arabidopsis*—a useful weed. *Cell* 1989, 56 : 263–264.
- Meyerowitz, E.M. : **Plants compared to animals : the broader comparative view of development**. *Science* 2002, **295 :** 1482–1485.

Références bibliographiques spécifiques

7.1 La plante modèle *Arabidopsis thaliana* a un cycle de vie court et un petit génome diploïde & 7.2 Le développement embryonnaire des plantes passe par différents stades

- Lloyd, C. : Plant morphogenesis : life on a different plane. *Curr. Biol.* 1995, **5** : 1085–1087.
- Mayer, U., Jürgens, G. : Pattern formation in plant embryogenesis : a reassessment. Semin. Cell Dev. Biol. 1998, 9 : 187–193.
- Meyerowitz, E.M. : Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* 1997, **88** : 299–308.
- Torres-Ruiz, R.A., Jürgens, G. : Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in Arabidopsis development. *Development* 1994, **120** : 2967–2978.

7.3 Des gradients d'auxine établissent l'axe apico-basal de l'embryon

- Breuninger, H., Rikirsch, E., Hermann, M., Ueda, M., Laux, T. : Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev. Cell* 2008, 14 : 867–876.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Jürgens, G. : Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 2003, 426 : 147–153.
- Jenik, P.D., Barton, M.K. : Surge and destroy : the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 2005, **132** : 3577–3585.
- Jürgens, G. : Axis formation in plant embryogenesis : cues and clues. *Cell* 1995, **81** : 467–470.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., Barton, M.K. : A member of the knotted class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 1995, **379** : 66–69.
- Szemenyei, H., Hannon, M., Long, J.A. : TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 2008, 319 : 1384–1386.

7.4 Les cellules somatiques de la plante peuvent donner naissance à des embryons et des plantules

Zimmerman, J.L. : Somatic embryogenesis : a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 1993, 5 : 1411–1423.

7.5 L'expansion cellulaire est un processus majeur dans la croissance des plantes et leur morphogenèse

- Backues, S.K., Konopka, C.A., McMichael, C.M., Bednarek, S.Y. : Bridging the divide between cytokinesis and cell expansion. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2007, **10 :** 607–615.
- Kuchen, E.K., Fox, S., Barbier de Reuille, P., Kennaway, R., Bensmihen, S., Avondo, J., Calder, G.M., Southam, P., Robinson, S., Bangham, A., Coen, E. : Generation of leaf shape through early patterns of growth and tissue polarity. *Science* 2012, 335 : 1092–1096.
- Tsuge, T., Tsukaya, H., Uchimiya, H. : **Two independent and** polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development* 1996, **122** : 1589–1600.

7.6 Un méristème contient une petite zone centrale de cellules souches capable de se renouveler

- Byrne, M.E., Kidner, C.A., Martienssen, R.A. : **Plant stem cells :** divergent pathways and common themes in shoots and roots. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003, **13 :** 551–557.
- Großhardt, R., Laux, T. : Stem cell regulation in the shoot meristem. J. Cell Sci. 2003, 116 : 1659–1666.
- Ma, H. : Gene regulation : Better late than never ? *Curr. Biol.* 2000, **10** : R365–R368.

7.7 La taille de l'aire occupée par les cellules souches dans le méristème est maintenue constante par une boucle de rétroaction en direction du centre organisateur

Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., Simon, R. : **Dependence of stem cell fate in** *Arabidopsis* **on a feedback loop regulated by** *CLV3* **activity**. *Science* 2000, **289** : 635–644.

Carles, C.C., Fletcher, J.C. : **Shoot apical meristem maintenance : the art of dynamical balance**. *Trends Plant Sci.* 2003, **8 :** 394–401.

- Clark, S.E. : **Cell signalling at the shoot meristem**. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, **2**: 277–284.
- Lenhard, M., Laux, T. : Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. Development 2003, 130 : 3163–3173.
- Reddy, G.V., Meyerowitz, E.M. : **Stem-cell homeostasis and** growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex. *Science* 2005, **310** : 663–667.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G., Laux, T. : The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 2000, 100 : 635–644.
- Vernoux, T., Benfey, P.N. : Signals that regulate stem cell activity during plant development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005, 15 : 388–394.

7.8 Le devenir des cellules des différentes couches du méristème peut être modifié en changeant leur position

Castellano, M.M., Sablowski, R. : Intercellular signalling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005, **8** : 26–31.

Gallagher, K.L., Benfey, P.N. : Not just another hole in the wall : understanding intercellular protein trafficking. *Genes Dev.* 2005, **19** : 189–195.

Laux, T., Mayer, K.F.X. : Cell fate regulation in the shoot meristem. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1998, 9 : 195–200.

Sinha, N.R., Williams, R.E., Hake, S. : Overexpression of the maize homeobox gene knotted-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev.* 1993, 7: 787–795.

Turner, I.J., Pumfrey, J.E. : Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 1992, **115** : 755–764.

Waites, R., Simon, R. : Signaling cell fate in plant meristems : three clubs on one tousle. *Cell* 2000, **103** : 835–838.

7.9 La carte des territoires présomptifs du méristème apical caulinaire embryonnaire peut être construite par analyse clonale

Irish, V.F. : **Cell lineage in plant development**. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1991, **1** : 169–173.

7.10 Le développement du méristème est dépendant de signaux issus d'autres parties de la plante

Doerner, P. : **Shoot meristems : intercellular signals keep the balance**. *Curr. Biol.* 1999, **9 :** R377–R380.

Irish, E.E., Nelson, T.M. : **Development of maize plants from cultured shoot apices**. *Planta* 1988, **175** : 9–12.

Sachs, T. : Pattern Formation in Plant Tissues. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

7.11 L'activité de gènes configure les axes proximo-distal et adaxial-abaxial des feuilles issues du méristème apical

Bowman, J.L. : Axial patterning in leaves and other lateral organs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000, **10** : 399–404.

Kidner, C.A., Martienssen, R.A.: Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. Nature 2004, 428 : 81–84.

Waites, R., Selvadurai, H.R., Oliver, I.R., Hudson, A. : The PHAN-TASTICA gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in Antirrhinum. Cell 1998, 93 : 779–789.

7.12 La disposition régulière des feuilles sur une tige est générée par un transport régulé d'auxine

Berleth, T., Scarpella, E., Prusinkiewicz, P. : Towards the systems biology of auxin-transport-mediated patterning. *Trends Plant Sci.* 2007, 12 : 151–159.

Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., Meyerowitz, E.M. : Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr. Biol.* 2005, 15 : 1899–1911.

Jönsson, H., Heisler, M.G., Shapiro, B.E., Meyerowitz, E.M., Mjolsness, E. : An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103 : 1633–1638.

Mitchison, G.J. : **Phyllotaxis and the Fibonacci series**. *Science* 1977, **196** : 270–275.

Reinhardt, D. : Regulation of phyllotaxis. Int. J. Dev. Biol. 2005, 49: 539–546.

Scheres, B. : Non-linear signaling for pattern formation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000, **3 :** 412–417.

Schiefelbein, J. : Cell-fate specification in the epidermis : a common patterning mechanism in the root and shoot. Curr. Opin. Plant Biol. 2003, 6 : 74–78. Smith, L.G., Hake, S. : The initiation and determination of leaves. Plant Cell 1992, 4: 1017–1027.

7.13 Les tissus racinaires sont produits par les méristèmes apicaux racinaires d'*Arabidopsis* par un ensemble de divisions cellulaires très stéréotypé.

Costa, S., Dolan, L. : Development of the root pole and patterning in Arabidopsis roots. Curr. Opin. Genet. Dev. 2000, 10 : 405–409.

Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., Sabatini, S. : A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 2008, **322** : 1380–1384.

Dolan, L. : Positional information and mobile transcriptional regulators determine cell pattern in *Arabidopsis* root epidermis. *J. Exp. Bot.* 2006, 57 : 51–54.

Grieneisen, V.A., Xu, J., Marée, A.F.M., Hogeweg P., Scheres, B. : Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 2007, 449 : 1008–1013.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfeldt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., Scheres, B. : An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 1999, 99 : 463–472.

Scheres, B., McKhann, H.I., van den Berg, C. : Roots redefined : anatomical and genetic analysis of root development. *Plant Physiol.* 1996, **111** : 959–964.

van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B. : **Short-range control of cell differentiation in the** *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 1997, **390 :** 287–289.

Veit, B. : **Plumbing the pattern of roots**. *Nature* 2007, **449** : 991–992.

7.14 Les poils absorbants sont spécifiés par une combinaison d'informations de position et d'inhibition latérale

Kwak, S.-H., Schiefelbein, J. : The role of the SCRAMBLED receptor-like kinase in patterning the *Arabidopsis* root epidermis. *Dev. Biol.* 2007, **302 :** 118–131.

Schiefelbein, J., Kwak, S.-H., Wieckowski, Y., Barron, C., Bruex, A. : **The gene regulatory network for root epidermal cell-type pattern formation in** *Arabidopsis. J. Exp. Bot.* 2009, **60** : 1515–1521.

7.15 Des gènes homéotiques contrôlent l'identité des organes dans la fleur

Bowman, J.L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U., Meyerowitz, E.M. : SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development* 1992, 114 : 599–615.

Breuil-Broyer, S., Morel, P., de Almeida-Engler, J., Coustham, V., Negrutiu, I., Trehin, C. : High-resolution boundary analysis during Arabidopsis thaliana flower development. *Plant J.* 2004, 38 : 182–192.

Coen, E.S., Meyerowitz, E.M. : The war of the whorls : genetic interactions controlling flower development. *Nature* 1991, **353 :** 31–37.

Irish, V.F.: Patterning the flower. Dev. Biol. 1999, 209: 211-220.

Krizek, B.A., Meyerowitz, E.M. : **The** *Arabidopsis* **homeotic genes** *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* 1996, **122** : 11–22. Krizek, B.A., Fletcher, J.C. : Molecular mechanisms of flower development : an armchair guide. Nat Rev. Genet. 2005, 6 : 688–698.

- Lohmann, J.U., Weigel, D. : Building beauty : the genetic control of floral patterning. *Dev. Cell* 2002, 2 : 135–142.
- Ma, H., dePamphilis, C. : The ABCs of floral evolution. *Cell* 2000, 101 : 5–8.
- Meyerowitz, E.M., Bowman, J.L., Brockman, L.L., Drews, G.M., Jack, T., Sieburth, L.E., Weigel, D. : A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development Suppl*. 1991, 1: 157–167.
- Meyerowitz, E.M. : **The genetics of flower development**. *Sci. Am.* 1994, **271** : 40–47.
- Sakai, H., Medrano, L.J., Meyerowitz, E.M. : Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries. Nature 1994, 378 : 199–203.
- Vincent, C.A., Carpenter, R., Coen, E.S.: Cell lineage patterns and homeotic gene activity during Antirrhinum flower development. *Curr. Biol.* 1995, 5: 1449–1458.

Wagner, D., Sablowski, R.W.M., Meyerowitz, E.M. : Transcriptional activation of *APETALA 1*. *Science* 1999, **285** : 582–584.

7.16 La fleur d Antirrhinum présente une organisation dorsoventrale et radiaire

Coen, E.S. : Floral symmetry. EMBO J. 1996, 15: 6777-6788.

Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Copsey, L., Coen, E. : Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. Nature 1996, 383 : 794–799.

7.17 La couche interne du méristème peut spécifier la mise en place du méristème floral

Szymkowiak, E.J., Sussex, I.M. : The internal meristem layer (L3) determines floral meristem size and carpel number in tomato periclinal chimeras. *Plant Cell* 1992, 4 : 1089–1100.

7.18 La transition du méristème caulinaire de l'état végétatif à l'état floral est sous contrôle génétique et environnemental

An, H., Roussot, C., Suarez-Lopez, P., Corbesier, L., Vincent, C., Pineiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C., Coupland, G. : **CONSTANS acts in the phloem to regulate** a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* 2004, **131** : 3615–3626.

Becroft, P.W. : Intercellular induction of homeotic gene expression in flower development. Trends Genet. 1995, 11: 253–255.

- Blázquez, M.A. : The right time and place for making flowers. *Science* 2005, **309** : 1024–1025.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G. : FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 2007, 316 : 1030–1033.
- Hake, S. : Transcription factors on the move. *Trends Genet*. 2001, **17**: 2–3.
- Jaeger, K.E., Wigge, P.A. : FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. Curr. Biol. 2007, 17: 1050–1054.
- Kobayashi, Y., Weigel, D. : Move on up, it's time for change mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev.* 2007, 21 : 2371–2384.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., Weigel, D. : A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 2001, 105 : 793–803.
- Putterill, J., Laurie, R., Macknight, R. : It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays* 2004, 26 : 363–373.
- Sheldon, C.C., Hills, M.J., Lister, C., Dean, C., Dennis, E.S., Peacock, W.J. : Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105 : 2214–2219.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., Coupland, G. : **Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering**. *Science* 2004, **303** : 1003–1006.

7.19 La plupart des plantes à fleurs sont hermaphrodites mais certaines produisent des fleurs unisexuées

- Irisa, E.N. : **Regulation of sex determination in maize**. *BioEssays* 1996, **18 :** 363–369.
- Huh, J.H., Bauer, M.J., Hsieh, T.-F., Fischer, R.L. : Cellular programming of plant gene imprinting. Cell 2008, 132 : 735–744.

8

Différenciation cellulaire et cellules souches

• Le contrôle de l'expression des gènes Modèles de différenciation cellulaire et cellules souches La plasticité de l'état différencié

Les premières différenciations de cellules non spécialisées en types cellulaires différents se produisent au sein de l'embryon en développement, mais ce phénomène continue après la naissance et même à l'âge adulte. Les caractéristiques des cellules spécialisées, par exemple les cellules sanguines, musculaires ou nerveuses, sont le résultat d'un profil particulier d'expression génique, qui détermine quelles protéines seront synthétisées. La mise en place et le maintien de ce profil d'expression génique particulier sont donc des questions essentielles pour la compréhension de la différenciation cellulaire. Elles seront abordées dans ce chapitre à la lumière de systèmes modèles bien étudiés. L'expression d'un gène est régulée par de nombreux mécanismes, dont l'action de facteurs de transcription, des modifications chimiques de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des protéines de la chromatine. Des signaux extérieurs jouent un rôle central dans la différenciation en activant des voies de signalisation intracellulaire qui modifient l'expression génique. Sera également abordé ici comment, après la naissance, de nombreux tissus se régénèrent sans cesse à partir de leurs propres cellules souches adultes, des cellules capables de s'auto-renouveler mais aussi de donner par différenciation l'ensemble des types cellulaires constituant le tissu concerné. Les propriétés des cellules souches embryonnaires de mammifère seront étudiées, cellules dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste (voir Chapitre 4) et pluripotentes, c'està-dire capables de donner tous les types cellulaires présents dans l'embryon. La plasticité de l'état différencié est une autre question importante : une cellule différenciée peut-elle évoluer vers un autre type cellulaire ? Ce type de modification possible sera étudié, bien que rare dans des conditions normales. Actuellement, il est démontré que le noyau d'une cellule différenciée, s'il est transféré dans un œuf énucléé, peut être reprogrammé et redevenir capable d'orchestrer un développement embryonnaire (ce qui permet le clonage animal). Plus récemment, des cellules différenciées ont été génétiquement reprogrammées pour revenir à un état proche de cellules souches pluripotentes : il est alors possible d'induire leur différenciation en différents types cellulaires. Ces cellules souches induites, comme les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes, ont des applications potentielles en médecine régénérative.

Au début du développement, les cellules embryonnaires présentent des morphologies similaires, puis par la suite, elles deviennent différentes et acquièrent des fonctions spécialisées. Comme cela a été vu dans les chapitres précédents, de nombreux processus du développement, telle la spécification précoce des feuillets embryonnaires, impliquent des modifications transitoires de la morphologie cellulaire, du profil d'expression génique et des protéines synthétisées. La différenciation cellulaire permet l'émergence progressive de types cellulaires clairement différents chez l'adulte comme les cellules nerveuses, les hématies, et les cellules adipeuses, (Fig. 8.1). Initialement, les cellules embryonnaires déterminées vers des types cellulaires différents ne sont distinguables que par de petites différences dans les profils d'expression génique et donc dans les protéines produites. La différenciation est une restriction progressive, au cours des générations cellulaires, des devenirs possibles pour des cellules qui acquièrent progressivement, les caractéristiques structurales associées à leur fonction spécialisée.

L'événement central de la différenciation cellulaire est, comme pour les processus plus précoces du développement, une modification progressive du lot de gènes exprimés par la cellule. Toutes les cellules produisent de façon continue les protéines de ménage impliquées dans le métabolisme général mais, avec la différenciation, des cellules commencent à synthétiser certaines protéines liées à leur fonction spécialisée. Les érythrocytes produisent l'hémoglobine (la protéine transporteuse de dioxygène) ; les cellules de l'épiderme synthétisent la kératine (une protéine fibreuse en partie responsable de la résistance de la peau) ; les neurones mettent en place les canaux voltage-dépendant qui leur permettent de générer un signal électrique ; les cellules musculaires produisent des isoformes spécifiques d'actine et de myosine permettant la contraction. Il est important de retenir que, parmi les milliers de gènes actifs dans une cellule de l'embryon à un stade donné, la détermination ou la différenciation peut n'en impliquer qu'un petit nombre. Les gènes exprimés dans un tissu particulier ou à un stade particulier du développement peuvent être



Fig. 8.1 Types de cellules

différenciées. Les types cellulaires de mammifère ont des formes et des tailles variées. Barres d'échelle : cellule épithéliale, 15 µm ; cellule adipeuse, 100 µm, cellule nerveuse : 100 µm-1 m ; neurone olfactif, 8 µm, bâtonnet de la rétine, 20 µm. détectés par des techniques de micropuces à ADN et de séquençage d'ARN (voir Encart 3B).

Si les stades précoces du développement sont caractérisés par des différences transitoires d'activités de gènes, les cellules différenciées atteignent au contraire un état stable dans lequel elles ne subissent aucun autre changement et ne se transforment pas en un autre type cellulaire. Elles sont alors qualifiées de **cellules en différenciation terminale**. Ces cellules ont souvent subi des modifications structurales importantes. Par exemple, les érythrocytes matures de mammifère (hématie) perdent leur noyau et deviennent des disques biconcaves remplis d'hémoglobine, alors que les neutrophiles, un type de leucocyte, ont leur noyau qui prend un aspect multilobé et leur cytoplasme qui se remplit de granules de sécrétion contenant des protéines impliquées dans la protection de l'organisme contre les infections. Pourtant, ces deux types cellulaires dérivent de la même lignée de cellules hématopoïétiques.

Pour une cellule, la première étape de la différenciation est son engagement vers un type cellulaire particulier (voir Section 1.12). Les premiers précurseurs déterminés des différents types cellulaires ne présentent pas de différences morphologiques entre eux. Les précurseurs des cellules musculaires et cartilagineuses, par exemple, ont le même aspect et pourraient être décrits comme des cellules indifférenciées, mais ils se différences fines entre les lots de gènes exprimés par ces précurseurs, et donc entre les protéines produites, qui contrôlent leur développement futur. La détermination est une étape clé initiant la différenciation. Les cellules déterminées formeront le type cellulaire correspondant à leur détermination, même si elles sont greffées dans un site différent de l'embryon : elles conservent leur identité (voir Fig. 1.23). Une cellule déterminée transmet cette détermination à toute sa descendance.

Dans certains cas, l'expression d'un seul gène peut suffire à la détermination. Le gène *myoD*, par exemple, code un facteur de transcription essentiel pour la différenciation musculaire. S'il est introduit expérimentalement dans des fibroblastes, un type cellulaire qui normalement n'exprime pas ce gène, ces cellules se différencient en cellules musculaires. Pour cette raison, myoD est souvent qualifié de gène régulateur maître. Les gènes maîtres sont des gènes dont l'expression est nécessaire et suffisante pour déclencher l'activation de l'ensemble de gènes constituant le programme qui permet la mise en place d'un tissu ou d'un organe particulier. Ils codent en général des facteurs de transcription. Comme cela sera vu plus loin dans ce chapitre, l'introduction dans des fibroblastes des gènes codant quatre des facteurs de transcription présents dans les cellules souches embryonnaires (cellules ES) de mammifère a un effet impressionnant. Les fibroblastes sont alors convertis en cellules pluripotentes : ils perdent toute trace de leur différenciation et, comme des cellules ES qui dérivent de la masse cellulaire interne et donnent naissance à toutes les cellules de l'embryon (voir Section 5.2), ils peuvent être induits à se différencier en cellules constitutives de tissus dérivant des trois feuillets embryonnaires.

L'initiation et la progression de la différenciation cellulaire sont sous le contrôle strict de signaux extracellulaires produits par d'autres cellules tels que des protéines membranaires, des molécules sécrétées comme les facteurs de croissance, ou des molécules de la matrice extracellulaire. Ces signaux extracellulaires sont souvent considérés comme « instructifs », mais il faut souligner qu'ils sont en général « sélectifs » dans le sens où, en pratique, les options de différenciation accessibles à une cellule à un instant donné sont limitées. Ces options sont imposées par l'état interne de cette cellule, lui-même conditionné par son histoire antérieure. Les signaux extracellulaires ne peuvent pas, par exemple, convertir une cellule endodermique en cellule musculaire ou nerveuse. En conséquence, les signaux qui agissent dans le développement précoce des vertébrés, avec les molécules Wnt, FGF, Notch ou les membres de la famille du TGF- β (voir Encart 4A), peuvent continuer à être utilisés avec des effets différents lors d'une détermination ou d'une différenciation.

Une particularité des cellules différenciées est qu'elles cessent totalement de se diviser ou qu'elles se divisent bien moins que des cellules non différenciées. Les cellules embryonnaires continuent à proliférer après leur détermination, mais l'arrêt des divisions cellulaires est nécessaire à la différenciation complète. Certaines cellules, comme les cellules musculaires squelettiques ou les cellules nerveuses, ne se divisent jamais après leur différenciation. D'autres, comme les fibroblastes ou les hépatocytes, peuvent se diviser après différenciation ; dans ce cas, l'état différencié, comme l'état déterminé, sont conservés au cours des divisions. La différenciation dépendant du profil d'activité génique, cela pose la question des mécanismes de mise en place et de transmission de ce profil au cours des divisions.

Tout d'abord vont être exposés les mécanismes généraux par lesquels un profil d'activité génique peut être établi, maintenu et transmis au cours d'une division cellulaire. Les bases moléculaires de la différenciation cellulaire seront ensuite présentées dans des exemples spécifiques en exploitant essentiellement la différenciation des cellules musculaires et sanguines. Les propriétés spéciales des cellules souches de mammifères seront aussi discutées à savoir celles des cellules ES, pluripotentes, et des cellules souches adultes, au potentiel plus limité et à partir desquelles les tissus comme le sang et la peau sont continuellement renouvelés au cours de la vie.

Enfin la réversibilité et la plasticité de l'état différencié seront considérées, particulièrement avec la reprogrammation des noyaux de cellules différenciées injectés dans des ovocytes, qui permet d'obtenir un embryon à partir du génome d'un noyau différencié. Ceci a rendu possible le clonage chez certaines espèces animales, c'est-à-dire l'obtention d'un animal génétiquement identique à l'animal donneur du noyau différencié. Le fait que des cellules totalement différenciées d'un organisme adulte peuvent être génétiquement reprogrammées vers un état pluripotent rappelant celui des cellules souches sera également discuté. Ce chapitre est consacré à la différenciation des cellules animales. Comme cela a été évoqué au Chapitre 7, les cellules végétales différenciées ne sont pas dans un état déterminé permanent, un petit fragment de tissu, ou même une seule cellule somatique, pouvant redonner une plante entière.

Le contrôle de l'expression des gènes

Tous les noyaux d'un organisme multicellulaire sont dérivés du seul noyau zygotique, présent dans l'œuf fécondé, et possèdent donc le même génome qui, dans l'espèce humaine, comporte environ 20 000 gènes. Mais les sous-ensembles de gènes qui sont actifs dans une cellule différenciée varient énormément d'un type cellulaire à l'autre. L'œuf lui-même présente un profil d'activité génique différent des cellules embryonnaires qui en dérivent. Comment l'expression de ces combinaisons différentes et uniques de gènes est-elle alors mise en place dans chaque type de cellule différenciée ? De plus, si quelques centaines de types cellulaires de base sont identifiables chez les mammifères, il existe en fait des millions de cellules fonctionnellement différentes chez ces organismes, chacune d'elles ayant son propre profil d'expression génique : il suffit de penser par exemple au nombre de neurones différents nécessaires au fonctionnement du système nerveux (voir Chapitre 12). Il y a moins de gènes dans le génome que de types de cellules différenciées à spécifier, par conséquent chaque type de cellule est forcément défini par l'expression d'une combinaison de gènes, et non d'un gène unique (Fig. 8.2). Ceci pose la question de comment est spécifié le profil d'expression génique dans une cellule différenciée, et comment il est transmis.

Pour comprendre les bases moléculaires de la différenciation cellulaire, il est d'abord nécessaire de savoir comment un gène peut être exprimé spécifiquement dans une cellule (pourquoi un gène donné est-il activé dans une cellule et pas dans une autre), avant de comprendre comment une combinaison particulière de gènes peut être sélectionnée et comment leur expression est coordonnée. L'attention sera portée ici sur la régulation de la **transcription**, la première (et en général la plus importante) étape de l'expression d'un gène et de la synthèse de protéine qui en résulte (voir Section 1.10). La **traduction** de l'ARNm en une protéine peut, elle-aussi, être contrôlée à différents niveaux. Un exemple de contrôle traductionnel au cours du développement précoce de la drosophile a été vu avec la protéine Nanos qui contrôle la production de la protéine Hunchback en empêchant la traduction des ARNm *hunchback* maternels (voir Section 2.9). Mais la différenciation cellulaire est essentiellement liée à la régulation transcriptionnelle de l'expression génique.



8.1 Le contrôle de la transcription implique des régulateurs transcriptionnels généraux et tissu-spécifiques

La plupart des gènes clés du développement sont initialement dans un état inactif. Leur activité dépend de facteurs de transcription capables de déclencher leur transcription. Ces **activateurs** se lient à l'ADN à proximité du gène sur des sites situés dans les régions *cis*-régulatrices (« *cis* » signifie simplement que la région régulatrice est sur la même molécule d'ADN que le gène contrôlé). Le site cible d'un facteur de transcription est une courte succession de nucléotides dont la séquence est reconnue spécifiquement par la protéine. Les sites auxquels différents activateurs peuvent se lier sont souvent regroupés dans une zone régulatrice nommée *enhancer* (ou amplificateur). L'importance des régions régulatrices pour l'expression tissu-spécifique d'un gène a été clairement démontrée par des expériences d'échanges de ces régions entre gènes tissus-spécifiques (Fig. 8.3). De tels échanges ont déjà été décrits, étant utilisés en routine en embryologie expérimentale pour forcer l'expression normale ou anormale d'un gène dans un tissu particulier, et pour marquer des cellules exprimant un gène donné dans le but de comprendre les fonctions de ce gène au cours du développement (voir Encart 3D et Encart 2E).

Dans les cellules eucaryotes, la plupart des gènes codant une protéine sont transcrits par l'ARN polymérase II. La polymérase se lie à l'ADN sur une région de contrôle, le **promoteur**, où elle est en bonne position pour que la transcription commence à l'endroit correct. La liaison de l'ARN polymérase II au promoteur implique la coopération d'un ensemble de **facteurs généraux de transcription**, ainsi dénommés car ils sont nécessaires à la transcription de tous les gènes transcrits par l'ARN polymérase II. Associés à la polymérase, ils forment le Fig. 8.2 Les différents types cellulaires résultent de l'expression de diverses combinaisons géniques. Une combinatoire d'expressions de gènes permet de spécifier différents types fonctionnels de cellules en exploitant efficacement le nombre relativement modeste de gènes présents dans le génome. Le nombre de types cellulaires spécifiés possible est ainsi bien plus grand que si chaque gène déterminait un seul type cellulaire. Cet exemple hypothétique montre comment un ensemble de trois gènes (X, Y et Z) pourrait spécifier huit types cellulaires différents par le jeu seul de combinaisons de ces gènes soit actifs (barre rouge) soit inactifs (barre grise) dans chaque type cellulaire.



Fig. 8.3 L'expression génique tissu-spécifique est contrôlée par des régions régulatrices. Normalement, l'hormone de croissance est produite par l'hypophyse et l'enzyme élastase I par le pancréas. Pour démontrer que les régions régulatrices d'un gène sont responsables de son expression tissu-spécifique, une construction constituée de la région de contrôle du gène de l'élastase I de souris suivie de

la séquence d'ADN codant l'hormone de croissance humaine a été injectée dans le noyau d'un œuf de souris fécondé, où elle s'est intégrée dans le génome. Lorsque la souris se développe, son pancréas produit de l'hormone de croissance humaine. Une séquence d'ADN de 213 paires de bases, qui inclut le promoteur de l'élastase l et d'autres zones régulatrices, est suffisante pour obtenir ce résultat. **complexe d'initiation de la transcription**, lié au promoteur. Pour des gènes très régulés, comme les gènes impliqués dans le développement, ce complexe ne peut pas se former et s'activer sans aide. Celle-ci est fournie par la liaison de protéines régulatrices sur des sites spécifiques de l'ADN définis par leur séquence nucléotidique. Ces protéines favorisent l'attraction et le positionnement des facteurs de transcription généraux et de la polymérase sur le promoteur (Fig. 8.4). Des **répresseurs**, protéines qui empêchent l'expression du gène, peuvent occuper certains sites régulateurs, y compris certains *enhancers*.

Le lieu et le moment d'expression d'un gène donné au cours du développement sont déterminés par les combinaisons particulières des protéines régulatrices qui se lient aux sites inclus dans ses régions régulatrices (Fig. 8.5). Typiquement, la séquence de ces sites comporte 7 à 10 nucléotides. Les génomes de la drosophile et de *C. elegans* comportent au moins 1 000 facteurs de transcription différents et environ 3 000 ont été identifiés dans le génome humain. En moyenne, la région régulatrice d'un gène peut lier à la fois 5 facteurs de transcription différents, et parfois beaucoup plus. De nombreux facteurs de transcription agissent sur les régions régulatrices de différents gènes, ce qui optimise l'utilisation du répertoire de ces facteurs. Un seul facteur peut ainsi coordonner l'activité de ces gènes, en en activant certains et en en réprimant d'autres (Fig. 8.6).



Fig. 8.4 L'expression génique est régulée par l'action coordonnée de protéines régulatrices qui se lient aux sites régulateurs portés par l'ADN. La plupart des gènes eucaryotes codant des protéines, y compris les gènes de développement très régulés, sont transcrits par l'ARN polymérase II. Le complexe protéique au cœur de la machinerie transcriptionnelle est composé de la polymérase, des facteurs généraux de transcription (par exemple TFIID) et du Médiateur. Ce complexe reconnaît le site promoteur et se lie à cette région de l'ADN à des séquences spécifiques, communes à tous les gènes transcrits par l'ARN polymérase II. Ces séquences, dites éléments principaux du promoteur, sont des plateformes d'assemblage du complexe central de transcription et déterminent le nucléotide au niveau duquel va commencer la transcription (TSS pour transcription start site). D'autres sites de contrôle sont gène-spécifiques et peuvent être occupés par des protéines activatrices ou répressives associées à leurs co-facteurs. Ces protéines interagissent avec le complexe de transcription pour initier ou empêcher la transcription. Ainsi, la combinaison d'activateurs et de répresseurs occupant les sites de contrôle détermine si un gène est exprimé ou pas dans une cellule donnée. Ces sites de contrôle peuvent être adjacents au promoteur ou en amont ou parfois en aval de la région codante du gène. Pour certains gènes, les sites de contrôle peuvent être à plusieurs kilobases de distance du TSS. Le contact entre ces protéines liées à des sites distants et la machinerie centrale de transcription est rendu possible par des replis en boucle de l'ADN. La régulation de l'expression génique nécessite une connexion physique entre activateurs, répresseurs et complexe ARN polymérase II : elle est assurée par l'intermédiaire d'un gros complexe multiprotéique, le Médiateur. Le complexe d'initiation de la transcription complet ainsi formé active alors l'ARN polymérase et la libère pour que la transcription démarre.

Illustration d'après Tjian, R. : **Molecular machines that control genes**. Sci. Am. 1995, **272 :** 54-61

Cette combinatoire de l'action des protéines régulatrices est une clé du contrôle de l'expression génique. Au cours du développement, elle permet le contrôle fin et la complexité de l'expression des gènes impliqués. La Fig. 2.37 montre les régions régulatrices qui contrôlent l'expression spatiale et temporelle du gène *eve* au cours du développement embryonnaire. La délimitation spatiale de l'expression de *eve* dans la seconde des sept bandes de l'embryon implique quatre protéines régulatrices différentes, incluant des activateurs et des répresseurs agissant sur 11 sites distincts. La Fig. 6.27 représente la région régulatrice du gène *endo-16* de l'oursin, qui code une protéine de la matrice extracellulaire liant le calcium. L'expression correcte de *Endo-16* au cours du développement de l'oursin nécessite la participation de 13 protéines régulatrices agissant sur 56 sites potentiels de régulation dans une région régulatrice qui s'étend sur 2,3 kilobases.

Au sein du promoteur, les sites liant les facteurs de transcription généraux et l'ARN polymérase déterminent le point « start » d'initiation de la transcription (voir Fig. 8.4). L'expression tissu- ou stade de développement- spécifique est contrôlée par des sites situés hors du promoteur, comme ceux sur lesquels les protéines régulatrices tissu-spécifiques se fixent. D'un gène à l'autre, ces sites sont très variables en séquence et en position. Ils peuvent être situés à des milliers de paires de bases du point « start ». Leur participation au contrôle de l'activité génique est rendue possible par les boucles que l'ADN peut former, qui amènent ces sites à proximité du promoteur. Les protéines liées à ces sites peuvent ainsi entrer en contact avec les protéines liées au promoteur, formant un **complexe d'initiation de la transcription** complètement actif (voir Fig. 8.4).

Les **co-activateurs** et **co-répresseurs** forment une autre classe importante de protéines régulatrices. Ils ne se lient pas à l'ADN eux-mêmes, mais fixent les activateurs et les répresseurs liés à l'ADN à la machinerie transcriptionnelle (voir Fig. 8.4). La β -caténine (produit final de la voie de signalisation Wnt) est un exemple de co-activateur déjà rencontré. Elle s'associe aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (voir Encart 4B). En l'absence de signal Wnt, les protéines TCF ancrées aux sites cibles de la voie Wnt sont liées à un co-répresseur (Groucho chez la drosophile, TLE chez l'Homme), et la transcription est réprimée. L'accumulation nucléaire de β -caténine due à l'activation de la voie Wnt provoque le déplacement de Groucho/TLE et la β -caténine se lie à TCF qu'elle transforme en activateur transcriptionnel.

Les régulateurs de la transcription se répartissent en deux groupes principaux. Certains, nécessaires à la transcription de gènes très variés, sont présents dans de nombreux types cellulaires différents. D'autres sont requis pour l'expression restreinte à un tissu (tissu-spécifique) d'un gène ou d'un ensemble de gènes particuliers et ne sont présents que dans un ou quelques types cellulaires. Ces deux types de facteurs de transcription seront évoqués dans les sections suivantes, lorsque seront abordées la régulation des gènes spécifiques des muscles dans les cellules précurseurs



Fig. 8.5 Les modifications de l'expression du gène eve au cours du développement sont liées à l'exploitation de régions régulatrices différentes. Chez la drosophile, le gène even-skipped (eve) est exprimé sous forme de bandes transversales dans l'embryon précoce. Cette expression est contrôlée par des modules de régulation (un par bande) situés en 5' du gène (décrits en détail dans la Section 2.22). Dans l'embryon tardif, eve est exprimé dans les précurseurs musculaires sous le contrôle d'une région régulatrice différente située en 3' du gène. La figure montre ici la combinaison des facteurs de transcription qui se lient à cette région dans un groupe particulier de muscles de chaque segment. Cinq facteurs de transcription différents agissent sur un ensemble de 17 sites dans cette région pour activer l'expression de eve. Certains de ces facteurs sont des effecteurs de voies de signalisation : Mad (BMP, TGF- β), Tcf (Wnt) et Ets (FGF). Des combinaisons différentes de ces facteurs contrôlent l'expression de eve dans d'autres groupes de muscles.



Fig. 8.6 Un même facteur de transcription peut activer ou inhiber l'expression de différents gènes. Les facteurs de transcription peuvent activer ou inhiber l'activité de gènes en se liant à leur région de contrôle. Dans la figure, la production du facteur de transcription X dans la cellule permet la synthèse de quatre nouvelles protéines (A, B, C et E) et inhibe la synthèse de la protéine D.

Illustration d'après Alberts B., et al. : Molecular Biology of the Cell, 2nd edition. New York : Garland Publishing, 1989. myogéniques et la différenciation des précurseurs des érythrocytes. En règle générale, il est raisonnable de supposer que l'activation de chaque gène implique une combinaison unique de facteurs de transcription.

Comme il a déjà été dit, les gènes du développement ont le plus souvent des régions de contrôle complexes, contenant des sites de liaison pour de nombreux facteurs de transcription activateurs ou inhibiteurs. L'activité d'un gène dépend donc des combinaisons précises et des concentrations de ces facteurs et de leurs co-activateurs et co-répresseurs dans la cellule. La combinaison particulière de protéines régulatrices présentes dans une cellule embryonnaire donnée à un instant donné est le résultat de son histoire au cours du développement et détermine l'étape suivante de sa différenciation.

8.2 L'expression des gènes est aussi contrôlée par des modifications chimiques et structurales de l'ADN et des protéines histones, qui modifient la structure de la chromatine

Dans toute cellule, certains gènes sont maintenus dans un état actif, alors que d'autres sont réprimés et inactifs. Au cours du développement en général, et de la différenciation cellulaire en particulier, des gènes inactifs peuvent s'activer alors que d'autres, initialement actifs, s'inactivent de façon définitive. Les facteurs de transcription ne sont pas le seul moyen de contrôle transcriptionnel disponible pour les cellules. Ils fonctionnent en fait contre un mécanisme à grande échelle capable soit de rendre les gènes accessibles pour la transcription, soit de les maintenir de façon permanente ou semi-permanente dans un état inactif. Ce mécanisme implique une modification de la chromatine, le complexe d'ADN, d'histones et d'autres protéines qui constitue les chromosomes. Les gènes non utilisés sont empaquetés (rendus silencieux) dans les cellules adéquates par des changements dans la chromatine qui les rendent inaccessibles pour les complexes de transcription. Ainsi, ce mécanisme général permet d'éteindre de très nombreux gènes sur de grandes périodes de temps sans qu'une production continue de protéines régulatrices spécifiques à chaque gène soit nécessaire. La chromatine condensée en une structure relativement compacte, qui empêche la transcription, est appelée hétérochromatine. Pour d'autres gènes, la chromatine est dans un état plus dispersé qui rend l'ADN accessible à la machinerie transcriptionnelle et au contrôle par des protéines régulatrices comme cela a été décrit dans la Section 8.1

La structure de la chromatine est donc le premier facteur qui détermine si une portion de chromosome peut être transcrite ou pas. La compaction de la chromatine qui se produit lors de la mitose, par exemple, lorsque les chromosomes deviennent visibles au microscope optique, empêche toute transcription. Des modifications analogues, mais plus localisées, pouvant persister tout au long du cycle cellulaire et être restaurées après la division cellulaire permettent l'extinction de gènes sur de longues périodes. Ces changements locaux de la structure et de la composition en protéines de la chromatine représentent un mécanisme d'inactivation génique à long terme. Ils sont provoqués par des modifications covalentes de l'ADN lui-même et de ses protéines histones associées (Encart 8A). Contrairement à des mutations, ces changements ne provoquant pas de modification de la séquence de l'ADN sont qualifiés de modifications épigénétiques. Ils sont dus à un ensemble dédié d'enzymes, dont certaines ajoutent des groupements chimiques et d'autres les enlèvent. Bien que certaines modifications épigénétiques soient en principe permanentes dans une cellule somatique et dans sa descendance, elles peuvent être inversées par un environnement particulier. Ce fait est démontré par la possibilité de reprogrammation d'un noyau de cellule somatique lors de sa transplantation dans un ovocyte énucléé (voir Fig. 1.20).

La méthylation de l'ADN est un exemple important de modification épigénétique qui maintient les gènes dans un état silencieux, en particulier chez les mammifères et les plantes. L'ADN méthylase est une enzyme capable de méthyler les cytosines dans les séquences cytosine-guanine (CpG) de certains sites de l'ADN. La méthylation de l'ADN concerne préférentiellement les promoteurs et les *enhancers*, et est corrélée avec l'absence de transcription des gènes proches. La méthylation de l'ADN est ENCART 8A Contrôle épigénétique de l'expression génique par des modifications de la chromatine

Au sein de la chromatine, la compaction de l'ADN est fondamentalement assurée par quatre types de protéines histones. Elle se fait sous forme de nucléosomes, des structures dans lesquelles l'ADN est enroulé autour d'un cœur constitué de huit histones. Ces protéines peuvent subir des modifica- Figure 1 tions post-traductionnelles (méthyla-



tion, acétylation ou phosphorylation) sur des résidus spécifiques, en particulier des lysines (K). Ces modifications sont liées à la régulation de l'activité génique (Figure 1). Méthylation et acétylation ont été les plus étudiées. Il est actuellement suggéré que le patron de ces modifications le long des histones associées à un gène constitue un code qui détermine si le gène est actif ou non, c'est-à-dire qu'il serait possible d'estimer l'activité d'un gène au cours du développement en fonction du profil des modifications de ses histones associées. L'acétylation des histones concerne souvent des régions de chromatine transcrites alors que l'effet des méthylations dépend de la position du résidu concerné et du nombre de groupements méthyle (jusqu'à trois) liés de façon covalente à la lysine. Par exemple, une monométhylation du résidu K4 de l'histone H3 est associée à une expression du gène mais l'effet dépend du degré de méthylation des résidus K9 et K27 de la même histone : si une monométhylation est aussi corrélée à une expression génique, une triméthylation est associée à une répression du gène en favorisant la formation d'hétérochromatine, inactive du point de vue de la transcription.

Les modifications chimiques, comme la méthylation de l'ADN et l'acétylation ou la méthylation des histones, agissent sur la structure de la chromatine en provoquant le recrutement de protéines qui reconnaissent les sites altérés et maintiennent

le statut transcriptionnel de la chromatine. Les protéines recrutées par les histones méthylées peuvent, en fonction du résidu méthylé, initier la formation d'hétérochromatine ou favoriser la transcription alors que l'acétylation des histones recrute des protéines qui maintiennent l'ADN accessible pour la transcription. Ces protéines peuvent à leur tour recruter des complexes protéiques qui affectent spécifiquement l'expression génique. Un exemple en a été vu chez la drosophile, où des protéines de la famille Polycomb maintiennent la répression des gènes Hox dans les cellules où ils ont été éteints tandis que des protéines de la famille Trithorax entretiennent l'expression de ces gènes dans les cellules où ils ont été activés (voir Section 2.30).

Les modifications de l'état de la chromatine se propagent souvent d'elles-mêmes, car les acétylations/déacétylations ou méthylations/déméthylations recrutent les enzymes responsables au sein de la chromatine, provoquant un « effet domino » qui étend la modification structurale le long du chromosome.

Ce phénomène est l'explication probable de l'activation séquentielle des gènes Hox dans l'ordre où ils apparaissent au sein du complexe de gènes (voir Encart 5E et Fig. 5.29). La relation entre les modifications des histones et l'expression des gènes du complexe Hoxd a été suivie, dans des bourgeons de queue isolés de souris au cours du développement, par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pour détecter les histones modifiées puis de l'analyse par micropuce à ADN (ChIP-chip) pour détecter les gènes concernés (Section 3.12). Au stade E8,5, les gènes Hoxd1-9 s'expriment déjà et leurs histones sont très acétylées mais, bien que l'acétylation débute dans la zone de Hoxd10, il y a très peu de trace d'acétylation sur la chromatine associée aux gènes Hox10-13, non actifs à ce stade, (Figure 2). Douze heures plus tard, au stade E9,0, la chromatine est acétylée dans la zone de Hoxd10, qui s'exprime. Au stade 9,5, l'acétylation s'est étendue aux autres gènes *Hoxd*, qui commencent tous à s'exprimer. De même, le suivi de la méthylation de la K27 de H3 permet d'observer l'effet inverse : les histones moins méthylées sont associées aux gènes actifs alors qu'une méthylation importante est observée pour les histones associées aux gènes non exprimés.





Données de la Fig. 2 d'après Soshnikova, N., Duboule, D. : Epigenetic temporal control of mouse Hox genes in vivo. Science 2009, 324 : 1320-1323.

l'un des mécanismes responsables de l'inactivation de certains gènes dans le génome maternel ou paternel, un processus connu sous le nom d'empreinte génomique (discuté dans la Section 10.8). Le profil de méthylation du chromosome X inactivé dans les cellules des mammifères femelles est différent de celui du chromosome actif, ce qui est sans doute lié à son inactivation (discuté dans la Section 10.17). Le profil de méthylation peut être transmis de façon fiable au cours de la réplication de l'ADN. Ce mécanisme peut expliquer la transmission d'un profil d'expression génique de cellule mère à cellule fille.

Les gènes peuvent aussi être inactivés, ou rendus potentiellement actifs, par des modifications des protéines constitutives des chromosomes. Dans la chromatine, l'ADN est enroulé autour de complexes de **protéines histones** et forme des structures nommées **nucléosomes**. Les histones peuvent subir différentes modifications chimiques post-traductionnelles (méthylation, acétylation ou phosphorylation) sur des acides aminés spécifiques, modifications qui influencent l'activité transcriptionnelle de l'ADN que ces histones compactent (voir Encart 8A). Ces modifications sont réalisées par des enzymes spécifiques, par exemple des histones acétyltransférases et histone méthyltransférases, et peuvent être inversées par d'autres enzymes, histone déacétylases et histone déméthylases, qui éliminent les groupements chimiques. Comme pour la méthylation de l'ADN, le profil de modification des histones peut être transmis aux cellules filles, créant ainsi une mémoire du statut transcriptionnel d'une région de l'ADN. Ce patron est cependant plus dynamique que celui de la méthylation de l'ADN.

8.3 Les profils d'activité génique peuvent être transmis grâce à la persistance de protéines régulatrices ou par le maintien des modifications de la chromatine

Une fois qu'elles sont engagées dans une voie de différenciation, les cellules embryonnaires continuent à proliférer et ne cessent en général de le faire que lors de la différenciation terminale. Certains types cellulaires continuent de se diviser après différenciation. Dans les deux cas, l'état déterminé ou différencié de la cellule est transmis à ses cellules filles, sur plusieurs générations. Comment un profil particulier d'activité génique peut-il être transmis intact au travers d'une réplication de l'ADN et d'une division cellulaire ?

Une première façon d'entretenir l'activité génique est d'assurer une production continue des protéines régulatrices nécessaires dans la cellule différenciée et dans sa descendance. Si le produit du gène agit lui-même comme un régulateur positif, seul l'événement initial d'activation du gène est nécessaire pour entretenir l'activité génique : une fois allumé, le gène reste actif. La protéine sera présente dans la cellule après division et peut donc relancer l'expression génique immédiatement (Fig. 8.7). Ce type de rétrocontrôle positif de l'expression génique sera vu dans le cas de la différenciation musculaire, où la protéine MyoD agit comme un activateur de son propre gène *myoD*. Chez la drosophile, le gène sélecteur *engrailed* reste actif dans la partie postérieure des segments pendant tout le développement embryonnaire et larvaire, comme chez l'adulte (voir Chapitre 2). Son expression est entretenue, au moins en partie, par un rétrocontrôle positif du facteur de transcription Engrailed sur son propre gène, bien après la disparition des facteurs transcription de type pair-rule qui ont initié l'expression d'*engrailed* dans l'embryon.

Une autre façon d'entretenir un profil particulier d'activité génique et de le transmettre aux cellules filles exploite le maintien de la structure de la chromatine. La première démonstration de la transmission au cours de nombreuses divisions cellulaires de l'état de condensation de la chromatine, et de l'inactivation de gènes sur une longue durée, a été fournie par l'inactivation du chromosome X des mammifères femelles. L'un des deux chromosomes X passe dans un état très condensé et inactif très tôt au cours de l'embryogenèse et est maintenu dans cet état tout au long de la vie de l'individu dans toutes les cellules somatiques. Dans ce cas, le mécanisme d'inactivation implique essentiellement la production d'un ARN non codant qui couvre le chromosome (décrit dans la Section 10.17). Les chromosomes X actifs et inactivés ont aussi des profils différents de méthylation de l'ADN. L'inactivation n'est pas



Fig. 8.7 L'expression continue de protéines régulatrice peut entretenir un profil d'activité génique stable dans une cellule différenciée et sa descendance. En haut : Le facteur de transcription A, produit par le gène A, agit en régulateur positif dans la région de contrôle de son propre gène. Après son activation, le gène A reste donc allumé et la cellule contient en permanence A. Ce facteur de transcription A agit aussi sur la région de contrôle des gènes *B* et C qu'il réprime et active, respectivement, ce qui permet la mise en place d'un patron d'expression génique cellule-spécifique. En bas : après division cellulaire, les cytoplasmes des deux cellules filles contiennent suffisamment de protéine A pour réactiver le gène A, et ainsi maintenir les profils d'expression des gènes B et C.

irréversible, puisque le chromosome X inactivé est réactivé dans la lignée germinale au cours de la formation des gamètes femelles, chacun contenant *in fine* un seul chromosome X.

Les patrons de méthylation de l'ADN et de modification des histones de la chromatine, peuvent tous deux être transmis aux cellules filles. Dans le cas de la méthylation de l'ADN, la réplication produit des molécules d'ADN double-brin portant les méthylations sur le brin parental. L'ADN méthylase reconnaît les cytosines méthylées dans les séquences CpG et méthyle la cytosine correspondante sur le brin néosynthétisé, ce qui restaure le patron sur ce brin (Fig. 8.8).

Les profils de modification des histones sont sans doute hérités de façon analogue. Lorsque l'ADN est répliqué, les nucléosomes sont déplacés, puis de nouveaux nucléosomes se réassemblent sur les deux nouvelles molécules d'ADN. Certaines des histones « parentales » modifiées sont retenues à proximité de l'ADN pendant la réplication et sont distribuées de façon aléatoire aux deux molécules filles. Elles reforment des nucléosomes avec des histones non modifiées. Comme il a été souligné dans la Section 8.2, l'état de la chromatine peut s'auto-propager localement car les histones modifiées recrutent les enzymes responsables de la modification à la chromatine. Ce processus est vraisemblablement à l'origine de la reconstitution de l'état de la chromatine après duplication du chromosome.

8.4 Des signaux extracellulaires peuvent déclencher les changements de profils d'activité génique lors de la différenciation

Il a été vu dans les chapitres précédents que l'effet des processus de signalisation cellule-cellule importants pour le développement est quasiment toujours d'induire une modification de l'expression génique de la cellule cible. Les protéines de signalisation extracellulaires, comme Wnt, Hedgehog, TGF- β , FGF ou Notch se lient à un récepteur membranaire. Le signal est alors transmis vers le noyau par une voie de signalisation intracellulaire (voir Encart 4B (Wnt), Encart 2F (Hedgehog), Encart 4C (TGF- β), Encart 4E (FGF) et Encart 5D (Notch)). Toutes ces voies de signalisation aboutissent à l'activation ou l'inactivation d'une protéine régulatrice de l'expression génique (Fig. 8.9).

Certaines molécules de signalisation importantes pour la différenciation n'agissent pas par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. C'est le cas de l'acide rétinoïque



Fig. 8.8 Transmission du patron de méthylation de l'ADN. Chez les vertébrés, au niveau des paires cytosine-guanine (CG) de l'ADN, la base cytosine est souvent méthylée (un groupe CH₃ est ajouté). Lors de la réplication, le nouveau brin complémentaire n'est pas méthylé mais le profil de méthylation peut être restauré par des méthylases. Ces enzymes reconnaissent la cytosine méthylée de la paire CG présente sur l'ancien brin et méthylent la cytosine de la paire CG correspondante du brin néosynthétisé.

Illustration d'après Alberts B., et al. : Molecular Biology of the Cell, 2nd edition. New York : Garland Publishing, 1989.

(voir Encart 5C) et des hormones stéroïdes testostérone et œstrogènes. L'acide rétinoïque est par exemple impliqué dans la différenciation des neurones du système nerveux central embryonnaire (voir Chapitre 12). La testostérone, produite dans le testicule, est responsable des caractères sexuels secondaires qui différencient les mammifères mâles des femelles (voir Chapitre 10). Ces molécules non protéiques, liposolubles, traversent seules la membrane plasmique. Dans le cytoplasme, elles se lient à un récepteur protéique et le complexe formé est alors capable d'agir comme régulateur transcriptionnel. Il se lie directement à des sites de contrôle sur l'ADN, nommés « éléments de réponse », et active, ou dans certains cas réprime, la transcription. Chez les insectes, l'hormone stéroïde ecdysone est responsable de la métamorphose (voir Chapitre 13). De façon analogue, elle agit par des récepteurs intracellulaires et déclenche la différenciation de nombreux types cellulaires. Dans tous ces cas, la molécule signal coordonne l'expression d'un ensemble de gènes en agissant, *via* son récepteur intracellulaire, sur un site de contrôle présent dans tous ces gènes.

Les œstrogènes sont impliqués dans un exemple classique d'expression génique tissu-spécifique, la production de la protéine ovalbumine par les cellules de l'oviducte de poulet. La transcription du gène ovalbumine requiert la présence continue d'œstrogènes, les ARNm ovalbumine et la protéine disparaissant en leur absence. Les œstrogènes circulants n'activent l'expression du gène ovalbumine que dans les cellules de l'oviducte, et n'affectent pas les autres cellules, comme les cellules hépatiques. En fait, malgré des décades de recherches, le mécanisme précis de cette expression restreinte du gène ovalbumine, l'une des plus tissu-spécifiques connue, reste obscur. Dans les cellules de l'oviducte, mais pas dans les autres cellules, les œstrogènes provoquent une modification de la structure de la chromatine dans la zone chromosomique contenant le gène ovalbumine, ce qui permet aux complexes hormone-récepteur d'avoir accès aux régions régulatrices du gène uniquement dans ces cellules de l'oviducte. Cet effet tissu-spécifique des œstrogènes implique l'existence d'autres activateurs, répresseurs et co-régulateurs tissu-spécifiques qui, sous stimulation œstrogénique, permettent l'expression du gène ovalbumine dans l'oviducte, mais empêchent son expression dans tous les autres tissus.



Fig. 8.9 Des signaux extracellulaires sont à l'origine de modifications de l'expression génique. Les signaux extracellulaires agissent par l'intermédiaire d'effecteurs, les récepteurs et les protéines de signalisation intracellulaire, qui assurent une transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Ces effecteurs peuvent modifier la régulation génique de différentes façons, par exemple en modifiant le niveau d'expression ou l'activation de gènes de facteurs de transcription, en agissant sur le complexe d'initiation de la transcription ou sur les facteurs épigénétiques modulant l'expression génique, comme les ADN méthylases ou les enzymes qui modifient certains groupements chimiques des histones (voir Encart 8A).

RÉSUMÉ

Le contrôle transcriptionnel est essentiel à la différenciation cellulaire. L'expression tissu-spécifique d'un gène eucaryote dépend de sites de contrôle localisés dans les régions régulatrices flanquant le gène. Ces sites incluent les séquences promotrices adjacentes au site « start » de la transcription, qui lient l'ARN polymérase, et des sites plus distants qui contrôlent la spécificité tissulaire ou temporelle de l'expression du gène. La combinaison des diverses protéines régulatrices liées aux différents sites détermine l'état actif ou inactif du gène. Ainsi, des différences minimes entre deux gènes par le nombre et le type de sites de contrôle dans leurs zones régulatrices peuvent produire des profils d'expression très différents. Dans certains cas, l'expression cellule-spécifique est due à la combinaison de protéines régulatrices présentes uniquement dans le type cellulaire concerné. Dans d'autres cas, l'expression génique peut être empêchée par le fait que la compaction de l'ADN rend le gène inaccessible aux facteurs de transcription et à l'ARN polymérase. Les protéines régulatrices n'interagissent pas seulement avec l'ADN, mais aussi entre elles, formant des complexes de transcription multiprotéiques responsables de l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase. Des signaux extracellulaires protéiques, comme les facteurs de croissance, n'entrent pas eux-mêmes dans la cellule mais peuvent agir spécifiquement sur l'expression génique par l'intermédiaire de récepteurs membranaires qui stimulent des voies de transduction intracellulaires. Les molécules signal qui peuvent diffuser à travers la membrane plasmique, comme l'acide rétinoïque ou les hormones stéroïdes, forment avec un récepteur intracellulaire protéique un complexe qui agit alors comme facteur de transcription pour modifier l'expression des gènes.

Une fois établi, le profil d'expression génique d'une cellule différenciée peut être maintenu dans le temps et être transmis à la descendance de la cellule. Ceci est rendu possible par la production et l'action continue de protéines régulatrices, et par des modifications structurales localisées et pérennes de la chromatine, liées à des modifications chimiques de l'ADN et des protéines histones.



Modèles de différenciation cellulaire et cellules souches

Pour souligner les principes essentiels sous-tendant la différenciation cellulaire, cette partie présente quelques exemples bien connus chez les mammifères. Tout d'abord seront décrites les bases moléculaires de la différenciation d'un type cellulaire, la cellule musculaire striée, à partir des cellules mésodermiques indifférenciées des somites (voir Section 5.13). Mais la différenciation cellulaire n'est pas limitée à l'embryon. La plupart des tissus différenciés ne durent pas éternellement et peuvent être renouvelés à partir de cellules souches indifférenciées, spécifiques de chaque tissu. Les exemples les mieux étudiés de cette différenciation de cellules souches adultes sont le sang, la peau et l'épithélium intestinal, qui subissent usure naturelle et perte de cellules de façon continue, et sont renouvelés tout au long de la vie. Un retour au muscle squelettique permettra de voir comment il se répare à l'âge adulte à partir d'une population spécifique de cellules souches musculaires, mise en réserve pendant le développement embryonnaire. La capacité limitée du système nerveux central à se renouveler via des cellules souches sera aussi abordée, ainsi que le cas des cellules souches embryonnaires et ce qui les rend pluripotentes.

8.5 La différenciation musculaire est déterminée par la famille de facteurs de transcription MyoD

Dans le Chapitre 5, nous avons étudié les signaux responsables de la spécification des cellules somitiques des embryons de vertébrés vers le type muscle ou cartilage. Ici l'intérêt est porté sur la différenciation des cellules qui formeront le muscle squelettique. La différenciation du muscle cardiaque à partir de cellules des lames latérales implique un ensemble de facteurs de transcription différent. La différenciation du muscle strié squelettique de vertébré peut être étudiée en culture cellulaire et représente un modèle de différenciation cellulaire riche en enseignements.

Les cellules musculaires squelettiques dérivent du myotome des somites. L'activité des facteurs de transcription à homéodomaine Pax3 et Pax7 engage les cellules somitiques vers le type musculaire. Ces cellules déterminées, mais pas encore différenciées, sont appelées **myoblastes**. Elles peuvent être isolées d'embryons de poulet ou de souris et cultivées *in vitro*. Les myoblastes murins peuvent être cultivés de manière clonale, avec des cultures de cellules dérivées d'une seule cellule. Les myoblastes continuent à proliférer tant que des facteurs de croissance sont présents dans le milieu de culture. En leur absence, la prolifération s'arrête et se manifeste le commencement de leur différenciation en cellules musculaires. Ce comportement illustre la nécessité de la sortie du cycle cellulaire pour la différenciation terminale. Les cellules commencent à synthétiser des protéines spécifiques de l'appareil contractile musculaire (actine, myosine II, tropomyosine) et des enzymes spécifiques musculaires (créatine phosphokinase)

La différenciation des myoblastes passe aussi par un changement structural. Ils prennent une forme en fuseau, le résultat d'une réorganisation du cytosquelette de microtubules, puis fusionnent pour former des **myotubes** multinucléés (Fig. 8.10). 20 heures environ après la privation de facteurs de croissance, des **fibres musculaires**



strié en culture. Les myoblastes sont des cellules engagées dans la voie musculaire mais qui ne montrent aucun signe visible de différenciation. En présence de facteurs de croissance, ils prolifèrent et ne se différencient pas. Lorsque les facteurs de croissance sont éliminés, les myoblastes cessent de se diviser, s'alignent et fusionnent en myotubes multinucléés, qui se contractent spontanément.





Fig. 8.11 Principales caractéristiques de la différenciation du muscle squelettique des vertébrés. Des signaux extracellulaires provoquent l'activation des gènes *mrf4, myf5* et *myoD* et initient la différenciation musculaire. En fonction des espèces, l'un de ces gènes est exprimé préférentiellement ; leur activité est auto-entretenue. Les facteurs de transcription Mrf4, Myf5 et MyoD, produits de ces gènes, activent les gènes de la différenciation myogénique comme *myogenin*, qui a son tour permet la production de protéines muscle-spécifiques, comme celles qui constituent l'appareil contractile.

striées typiques peuvent être observées. *In vivo*, la présence de l'intégrine β_1 à la membrane cellulaire est nécessaire à la fusion.

MyoD fait partie d'une famille de facteurs de transcription à domaine héliceboucle-hélice basique produite exclusivement par les cellules précurseurs de muscle ou les cellules musculaires. Ces protéines peuvent être considérées comme des facteurs clé de la différenciation musculaire, car elles activent les gènes muscle-spécifiques et donc la différenciation. Outre myoD, cette famille comporte trois autres gènes : mrf4, myf5 et myogenin. Transfectés dans des fibroblastes ou d'autres cellules non musculaires, qui n'expriment ni ces gènes ni des protéines spécifiquement musculaires, ils peuvent chacun induire la différenciation de ces cellules en muscle. Chez les mammifères, mrf4, myf5 et myoD sont les premiers gènes à être activés dans les précurseurs musculaires et ils agissent comme des gènes de détermination musculaire (Fig. 8.11). Ils sont aussi activés par le facteur de transcription Pax3, dont la production est progressivement restreinte aux précurseurs musculaires (voir Section 5.13). Une fois allumés, ces gènes maintiennent leur propre expression par un rétrocontrôle positif du type illustré par la Fig. 8.11. Les protéines Mrf4, Myf5 et MyoD peuvent toutes activer le gène myogenin, qui est impliqué dans la différenciation structurale et la maturation fonctionnelle musculaires. Mrf4, Myf5 et MyoD sont produites dans des cellules myogéniques en prolifération, non différenciées alors que la myogénine n'est produite que dans des cellules en différenciation, qui ne se divisent plus. Mrf4 a aussi un rôle dans la maturation des fibres musculaires.

Malgré la démonstration de l'effet de MyoD dans la détermination musculaire *in vitro*, les expériences d'invalidation génique utilisant des souris transgéniques (voir Section 3.10 et Encart 3D) ont prouvé que des souris dépourvues de *myoD* mettent en place du muscle squelettique normal si *myf5* est fonctionnel, ce qui suggère une redondance fonctionnelle entre ces deux gènes : l'une des protéines peut pallier l'absence de l'autre. Cette apparente redondance est fréquente dans le développement et a probablement été sélectionnée comme système de sécurité permettant un développement normal en dépit de fluctuations dans l'expression génique (voir Section 1.19). Des souris ayant seul *myf5* invalidé font également du muscle, même si elles montrent d'autres anomalies, la plus évidente étant un raccourcissement des côtes. Les souris chez lesquelles *myf5* et *myoD* sont invalidés meurent avant la naissance et les embryons ne présentent des cellules musculaires que si *mrf4* parvient à s'exprimer.

D'autres expériences ont confirmé l'action de détermination de ces facteurs de transcription. Les précurseurs musculaires potentiels peuvent être identifiés individuellement dans des souris portant des versions mutantes de *myf5* et *myoD* qui sont activés comme les gènes normaux (ainsi l'ARNm modifié peut être détecté) mais qui ne produisent pas de protéine Myf5 ou MyoD fonctionnelle. Ces cellules ne deviennent pas des myoblastes, n'atteignent pas la localisation habituelle de ces derniers et peuvent même suivre d'autres voies de différenciation, comme celle du cartilage ou de l'os.

Contrairement à ce qui est observé lorsque le gène *myoD* est inactivé expérimentalement, des souris dont le gène *myogenin* est invalidé, mettent en place des myoblastes, mais l'essentiel des muscles squelettiques est absent. La myogénine est donc considérée comme un **facteur de différenciation** plutôt qu'une protéine essentielle pour la détermination musculaire.

Les facteurs de transcription de la famille MyoD activent la transcription des gènes muscle-spécifiques en se liant à une séquence de nucléotides, la boîte E, présente dans les régions régulatrices de ces gènes. MyoD forme des hétérodimères avec des produits du gène E2.2, comme E_{12} , et ces dimères se lient à la boîte E. Comme l'activité de MyoD et des autres facteurs est essentielle à la différenciation musculaire, les modalités de régulation de cette activité vont maintenant être examinées.

8.6 La différenciation musculaire implique une sortie du cycle cellulaire mais est réversible

Prolifération et différenciation sont mutuellement exclusives pour les myoblastes. Les myoblastes squelettiques qui prolifèrent en culture ne se différencient pas. La différenciation commence seulement lorsque la prolifération cesse. En présence de facteurs de croissance, des myoblastes produisant à la fois MyoD et Myf5 continuent de proliférer et ne se différencient pas en muscle. Cela signifie que la présence de MyoD et Myf5 n'est pas en elle-même suffisante pour promouvoir la différenciation musculaire et qu'un signal ou des signaux additionnels sont nécessaires. En culture, supprimer les facteurs de croissance du milieu est un stimulus pour la différenciation. Les myoblastes sortent alors du cycle cellulaire, les fusions cellulaires commencent et la différenciation s'engage.

Il y a une relation intime entre les protéines qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire et les facteurs de détermination et de différenciation musculaire. MyoD et Myf5 sont phophorylés par les protéines kinases cycline-dépendantes activées pendant le cycle cellulaire (voir Fig. 13.4). La phosphorylation rend MyoD et Myf5 plus susceptibles d'être dégradés. Ainsi, dans des cellules en prolifération active, la concentration de facteurs myogéniques est maintenue faible. De plus, d'autres protéines interagissent avec les facteurs myogéniques ou leurs partenaires comme E_{12} , et inhibent leur activité. L'une de ces protéines est le facteur de transcription Id, présent en forte concentration dans les cellules en prolifération, qui aide probablement à éviter une activation prématurée des gènes muscle-spécifiques.

Les facteurs myogéniques provoquent eux-mêmes la sortie du cycle cellulaire. MyoD et myogénine activent la transcription de protéines de la famille p21, qui bloquent la progression du cycle cellulaire : la cellule sort alors du cycle et se différencie. La protéine du rétinoblastome (RB) est une autre protéine importante de ce contrôle. Dans les cellules en prolifération, RB est phosphorylée par la kinase cycline-dépendante 4 (Cdk4) et la déphosphorylation de RB est essentielle pour la sortie du cycle cellulaire et la différenciation musculaire. MyoD peut interagir fortement et spécifiquement avec Cdk4 et inhibe alors la phosphorylation de RB, ce qui favorise la sortie du cycle cellulaire.

Un autre mécanisme, plus général, est également impliqué dans la répression des gènes de la prolifération cellulaire des cellules musculaires. De façon surprenante, il passe par une modification des éléments du complexe de transcription. TFIID est l'un des facteurs généraux de transcription constituant le complexe générique décrit dans la Fig. 8.4. Cette protéine multimérique reconnaît une séquence constitutive des promoteurs. TFIID agit sur l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la progression **Fig. 8.12** L'arrêt de la prolifération des myoblastes et leur entrée en différenciation musculaire s'accompagnent d'une modification du complexe central de transcription. Dans les myoblastes, comme dans la plupart des cellules étudiées, le complexe central de transcription contient le facteur général de transcription TFIID, qui reconnaît un élément principal du promoteur. Dans les myotubes en différenciation TFIID est désassemblé et probablement remplacé par un complexe contenant les protéines TRF3 et TAF3. En synergie avec des activateurs spécifiques, ce complexe reconnaît le promoteur du gène *myogenin* et initie sa transcription.

du cycle et de la division cellulaire. Lorsque les myoblastes entrent en différenciation terminale, TFIID est dissocié en ses sous-unités et est remplacé par un complexe protéique différent, qui contrôle l'expression de gènes de différenciation comme celui de la myogénine (Fig. 8.12). Ce remplacement active sélectivement un programme transcriptionnel dans la cellule tout en en inhibant un autre. Ce processus pourrait être un mécanisme général d'inactivation de la prolifération et d'initiation de la différenciation cellulaire.

L'opposition entre prolifération et différenciation terminale semble logique du point de vue du développement. Pour les tissus dont les cellules totalement différenciées ne se divisent plus, il est essentiel que soit produit un nombre suffisant de cellules pour obtenir une structure fonctionnelle, comme un muscle, avant que la différenciation ne commence. Le fait que l'induction de la différenciation ou que, pour une cellule prête à se différencier, l'autorisation de le faire dépende de signaux externes, permet d'assurer que la différenciation ne se produit que dans des conditions adéquates.

En dépit de l'allure définitive de leur différenciation, les cellules musculaires sont un exemple de cellules différenciées qui peuvent subir une **dédifférenciation** (la perte du phénotype différencié), entrer à nouveau dans le cycle cellulaire, et même lorsqu'elles sont manipulées en culture, donner naissance à d'autres types cellulaires, phénomène nommé **transdifférenciation**. Le gène *msx1* code un répresseur transcriptionnel à homéodomaine et s'exprime dans des myoblastes déterminés, mais non différenciés, à l'extrémité du bourgeon de membre. Lorsque des myotubes de souris en culture sont transfectés par *msx1*, 5-10 % de ces myotubes se dédifférencient, formant par fission des myotubes multinucléés plus petits et même des cellules mononucléées capables de divisions cellulaires. Si ces cellules sont cultivées dans des conditions appropriées, certaines cellules filles d'un même myotube expriment des marqueurs d'autres types cellulaires, comme les cellules cartilagineuses ou adipeuses. La régénération de la patte d'amphibien était un exemple classique dans lequel une transdifférenciation de cellules musculaires en d'autres types cellulaires semblait impliquée. Il a cependant été démontré que ce n'est pas le cas chez l'axolotl (voir Chapitre 13).

Une fois mises en place, les cellules musculaires squelettiques peuvent grossir par croissance cellulaire mais ne se divisent pas. Elles peuvent toutefois être remplacées, comme il sera vu plus tard, à partir de cellules souches musculaires.

8.7 Toutes les cellules sanguines dérivent de cellules souches multipotentes

L'hématopoïèse, ou formation du sang, est un exemple de différenciation particulièrement bien étudié, non seulement parce que les cellules hématopoïétiques sont relativement accessibles à tous les stades de leur différenciation chez l'animal adulte, mais aussi pour son importance médicale. Le processus est continu, environ 2 millions de cellules sanguines nouvelles étant produites par seconde chez l'espèce humaine pour maintenir environ 25×10^{12} cellules sanguines circulantes. L'hématopoïèse implique la différenciation de cellules souches **multipotentes**, chacune donnant naissance à un certain nombre, important mais limité, de types de cellules différenciés (voir Section 1.17). L'ensemble du processus de l'hématopoïèse et les signaux externes qui l'influencent vont être étudiés avant d'aborder le contrôle de l'expression génique dans un cas, celui du développement de l'érythrocyte.

Toutes les cellules sanguines d'un mammifère adulte dérivent de **cellules souches** hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse¹. Ces cellules sont d'origine



¹ Des études récentes ont révélé que chez la souris adulte, près de 50 % des plaquettes sanguines auraient une origine pulmonaire (NdT).





mésodermique, et apparaissent dans les îlots sanguins de la vésicule vitelline de l'embryon précoce. Elles sont ensuite localisées dans la région de l'aorte, puis dans une série de sites hématopoïétiques, dont le foie embryonnaire et la moelle osseuse adulte. Les cellules souches hématopoïétiques ont non seulement la capacité de s'auto-renouveler mais aussi celle de donner des progéniteurs, cellules qui sont déterminées vers l'une des lignées hématopoïétiques et agissent comme des compartiments d'amplification. L'hématopoïèse représente donc un système de développement complet en miniature, dans lequel une seule cellule, la cellule souche multipotente, donne naissance à de nombreux types cellulaires. L'hématopoïèse se produit tout au long de la vie, permettant un renouvellement continu des cellules sanguines. Des études ont montré que les cellules souches hématopoïétiques du foie embryonnaire produisent environ 200 facteurs de transcription, un nombre analogue de protéines membranaires et environ 150 molécules de signalisation, ce qui illustre leur complexité.

Dans la circulation se trouvent de nombreux types cellulaires totalement différenciés, mais aussi des cellules immatures à différents stades de différenciation (Fig. 8.13). Tous ces types cellulaires appartiennent à trois principales lignées : érythroïde, lymphoïde et myéloïde. La lignée érythroïde donne les érythrocytes (globules rouges), ainsi que les mégacaryocytes, qui sont à l'origine des plaquettes sanguines.

La lignée lymphoïde produit les lymphocytes, en particulier les deux types cellulaires antigène-spécifiques du système immunitaire : les lymphocytes B et T. Chez les mammifères, les lymphocytes B se différencient dans la moelle osseuse, alors que les lymphocytes T se différencient dans le thymus, à partir de précurseurs issus des cellules souches multipotentes de la moelle osseuse et migrant dans le thymus *via* la circulation sanguine. Les lymphocytes B et T achèvent leur différenciation après avoir été en contact avec des antigènes. Les lymphocytes B deviennent des plasmocytes (cellules sécrétrices d'anticorps) alors que la différenciation terminale des lymphocytes T donne au moins six types différents de cellules T effectrices. Chez les vertébrés, les lymphocytes B et T représentent les seuls exemples connus de différenciation cellulaire impliquant une altération irréversible de l'ADN, créée par un processus de recombinaison somatique qui peut potentiellement générer des milliards de récepteurs antigéniques différents.

La lignée myéloïde donne naissance au reste des leucocytes (cellules blanches) : les granulocytes ou leucocytes polynucléaires (comprenant les éosinophiles, neutrophiles et basophiles), les mastocytes et les monocytes. Les monocytes se différencient en macrophages après avoir quitté la moelle osseuse et être entrés dans les tissus. Les mastocytes se trouvent également dans les tissus.

Dans la moelle osseuse, les différents types de cellules sanguines et leurs précurseurs sont intimement mélangés avec des cellules mésenchymateuses, les **cellules stromales de la moelle osseuse**. La capacité des cellules souches à s'auto-renouveler et à se différencier en différents types cellulaires est finement régulée par le microenvironnement cellulaire et moléculaire qui constitue la « niche » dans lequel elles vivent et dont leur survie dépend. Dans le cas de l'hématopoïèse, cette **niche des cellules souches** est fournie par les cellules stromales. L'implication de protéines sécrétées des familles Wnt et BMP, de ligands membranaires de Notch stimulant après contact cellulaire la voie Notch dans les cellules cibles, de l'acide rétinoïque et de la prostaglandine E_2 a été démontrée dans le maintien de la prolifération et de l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques dans leur niche.

Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes n'ont pas été directement observées, mais leur existence est suggérée par le fait qu'une transplantation de moelle osseuse dans un organisme dont la moelle a été détruite permet de reconstituer un système sanguin et immunitaire complet. Des expériences ont montré que cette capacité existe dans des cellules isolées, un fait exploité en thérapeutique lors du traitement de maladies du sang ou du système immunitaire par transplantation de moelle osseuse. Une expérience fondamentale a permis, il y a une soixantaine d'années, de démontrer cette capacité par la transfusion d'une suspension de cellules de moelle osseuse dans une souris ayant été irradiée aux rayons X à une dose létale. Normalement, cette irradiation provoque la disparition des cellules sanguines, les cellules qui prolifèrent étant particulièrement sensibles aux radiations, et donc la mort de la souris. Mais la transfusion a permis la reconstitution du système hématopoïétique et la survie de la souris. Actuellement, d'autres sources de cellules souches hématopoïétiques, comme le sang de cordon ombilical, sont aussi utilisées en routine pour les transplantations.

Les cellules souches multipotentes génèrent des progéniteurs non déterminés, qui s'engagent irréversiblement dans l'une des trois lignées principales et continuent à se diviser avant leur différenciation terminale. L'engagement dans la lignée érythroïde-myéloïde ou lymphoïde est précoce. Il précède une spécification dans les différentes lignées qui s'accompagne d'une différenciation morphologique en types cellulaires fonctionnels reconnaissables. Le système hématopoïétique peut donc être considéré comme un système hiérarchique dont la cellule souche hématopoïétique multipotente est le sommet (voir Fig. 8.13). Tous les stades de la différenciation sont régulés par des signaux extracellulaires sous forme de facteurs de croissance hématopoïétiques. Pour les cellules sanguines qui se différencient dans la moelle osseuse, la plupart des signaux sont produits par les cellules stromales de la moelle. Ainsi, les populations des différents types de cellules sanguines peuvent être régulées en fonction des besoins physiologiques. Par exemple, une perte de sang provoque une augmentation de la production d'érythrocytes alors qu'une infection entraîne une activation de la production des lymphocytes et des autres leucocytes. Une leucémie peut apparaître si les leucocytes se maintiennent en prolifération au lieu de se différencier : les cellules sont bloquées dans l'un des stades immatures Fig. 8.14 Hiérarchie des facteurs nécessaires à la différenciation des types cellulaires dans les lignées hématopoïétiques. Au sommet de la hiérarchie, les progéniteurs communs aux lignées érythroïde et myéloïde sont orientés vers la lignée mégacaryocytes - érythrocytes ou la lignée granulocyte - macrophage en fonction de leur concentration en GATA1 et en PU.1. Les progéniteurs produisent de faibles quantités de ces facteurs, qui s'inhibent l'un l'autre tout en activant chacun leur propre production ce qui finit par permettre l'expression stabilisée de l'un d'entre eux seulement dans les différentes cellules. GATA1 et PU.1 activent alors des programmes séquentiels de différenciation, par l'intermédiaire de codes transcriptionnels combinatoires. À noter qu'un même facteur de transcription peut contribuer à l'établissement de différents types cellulaires en agissant au sein de différentes combinaisons de facteurs.

D'après Orkin, S.H., Zon L.I. : **Hematopoiesis An evolving paradigm for stem cell biology.** Cell, 2008, **132** : 631-644.



de leur différenciation normale, qui peut être identifié en fonction des molécules exprimées à la surface cellulaire.

Une question centrale de la biologie des cellules souches est la compréhension du mécanisme permettant à une cellule unique de se diviser en donnant deux cellules filles dont l'une restera cellule souche alors que l'autre donnera une lignée de cellules différenciées. Une première possibilité est que les cellules filles soient intrinsèquement différentes, les cellules filles ne recevant pas les mêmes protéines en raison de la division asymétrique de la cellule souche. Le développement des neuroblastes chez la drosophile, étudié au Chapitre 12, offre un exemple clair de ce type de division. Une seconde possibilité est que l'asymétrie soit liée à des signaux externes : une cellule fille, maintenue dans la niche des cellules souches, continue à s'auto-renouveler alors que l'autre, écartée de la niche, se différencie. Dans le cas de l'hématopoïèse, les deux mécanismes semblent présents. Lorsque des cellules hématopoïétiques humaines sont cultivées en l'absence de cellules stromales, à l'origine de la niche des cellules souches *in vivo*, la répartition asymétrique de quatre protéines lors des divisions cellulaires a été prouvée. Mais la production de facteurs capables de contrôler l'auto-renouvellement des cellules souches par les cellules stromales a aussi été démontrée.

8.8 Des facteurs intrinsèques et extrinsèques contrôlent la différenciation des lignées hématopoïétiques

En miroir de l'organisation hiérarchique des types cellulaires au cours de l'hématopoïèse, il peut être décrit une hiérarchie de facteurs de transcription, dont les profils d'expression superposés spécifient les différentes lignées cellulaires. Certains

Quelques facteurs de croissance hématopoïétiques et leurs cellules cibles	
Type de facteur de croissance	Cellules hématopoïétiques cibles
Érythropoïétine (EPO) G-CSF (pour <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>) GM-CSF (pour <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>) Interleukine-3 CSF (pour <i>Stem Cell Factor</i>) M-CSF (pour <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)	Progéniteurs érythroïdes Granulocytes, neutrophiles Granulocytes, macrophages Précurseurs multipotents Cellules souches Macrophages, granulocytes

Fig. 8.15 Les facteurs de croissance hématopoïétiques et leurs cellules cibles.

ne sont exprimés que dans les cellules immatures et ne sont pas spécifiques d'une lignée. De façon inattendue, les précurseurs hématopoïétiques expriment à bas niveau certains gènes qui ne seront exprimés ensuite que dans les lignées myéloïde ou érythroïde. La détermination des lignées s'accompagne donc d'activations et de répressions de gènes. Quelques-unes des combinaisons de facteurs de transcription requises pour la différenciation de types cellulaires des lignées érythroïde et myéloïde sont illustrées dans la Fig. 8.14.

Le facteur de transcription GATA1, par exemple, est nécessaire à la différenciation de la lignée érythroïde, alors que PU.1, un autre facteur clé, oriente la différenciation vers la lignée myéloïde. La concentration relative de ces deux protéines détermine la destinée de la cellule car GATA1 et PU.1 se lient l'un à l'autre, inhibant ainsi mutuellement leur capacité à réguler la transcription des gènes spécifiques des lignées concernées. Une concentration en GATA1 faible permettra à PU.1 d'activer le programme myéloïde alors que si la concentration en PU.1 est faible, GATA1 pourra activer le programme érythroïde. Comme pour tous les types cellulaires, la combinaison de facteurs de transcription, et non l'un d'eux en particulier, est responsable du profil d'expression génique spécifique d'un type cellulaire.

Comment l'activité de tous ces facteurs est-elle contrôlée ? Les signaux délivrés par des facteurs de croissance ou de différenciation extracellulaires jouent un rôle capital. Des études sur la différenciation de cellules sanguines en culture ont identifié au moins 20 protéines extracellulaires, regroupées sous les noms de facteurs stimulateurs de colonie (ou CSF pour *Colony-Stimulating Factors*) ou facteurs de croissance hématopoïétique qui, avec le concours de signaux plus généraux peuvent moduler la prolifération et la différenciation cellulaire à différentes étapes de l'hématopoïèse (Fig. 8.15). Des stimulateurs et des inhibiteurs ont été identifiés. Les cellules sanguines et les cellules stromales ne sont pas les seules cellules impliquées. L'érythropoïétine (EPO), par exemple, qui induit la différenciation des précurseurs d'érythrocytes, est produite essentiellement par le rein en réponse à des indicateurs physiologiques de déplétion érythrocytaire.

Bien que le rôle de ces facteurs dans la prolifération et la différenciation des cellules sanguines semble bien établi, il est possible que l'engagement d'une cellule dans l'une ou l'autre voie de la lignée myéloïde soit dû au hasard, les facteurs de croissance n'assurant qu'un rôle de survie pour des lignées cellulaires particulières. Ceci est suggéré par des expériences dans lesquelles les deux cellules filles d'un même progéniteur (qui peut donner une gamme de différents types de cellules sanguines) sont cultivées séparément mais dans les mêmes conditions. Habituellement les cellules filles génèrent la même combinatoire de types cellulaires, mais dans 20 % des cas, il y a des différences.

Dans cette pléthore de facteurs de croissance, il est difficile de distinguer ceux qui agissent spécifiquement sur la différenciation et ceux qui sont requis pour la survie et la prolifération d'une lignée. Les rôles de trois facteurs de croissance, **GM-CSF** (*pour Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), **M-CSF** (*pour Macrophage Colony-Stimulating Factor*), et **G-CSF** (*pour Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), ont été bien établis. Le GM-CSF est nécessaire au développement de la plupart des cellules myéloïdes, dès les stades progéniteurs les plus précoces



Fig. 8.16 Les facteurs stimulateurs de colonie peuvent orienter la différenciation des neutrophiles et des macrophages. Neutrophiles et macrophages dérivent d'un progéniteur granulocyte-macrophage commun. Le choix de la voie de différenciation peut être imposé par, par exemple, les facteurs de croissance G-CSF et M-CSF. De plus, le facteur de croissance GM-CSF et IL-3 sont tous deux généralement nécessaires pour promouvoir la survie et la prolifération des cellules de la lignée myéloïde.

Illustration d'après Metcalf, D. : Control of granulocytes and macrophages : molecular, cellular, and clinical aspects. Science 1991, 254 : 529-533.

identifiés. Associé au G-CSF, il stimule principalement la différenciation de granulocytes, principalement des neutrophiles. Au contraire, à partir des mêmes progéniteurs, la présence de M-CSF en plus du GM-CSF tend à promouvoir la différenciation de monocytes qui deviendront des macrophages (Fig. 8.16).

Aucun de ces facteurs de croissance ou de différenciation n'exerce un effet restreint à l'un des types cellulaires. Par contre, la combinatoire de leurs actions sur les cellules cibles produit des résultats différents, qui dépendent aussi du passé de ces cellules en terme de développement, autrement dit des protéines déjà liées à l'ADN et des modifications de la chromatine déjà en place.

8.9 L'expression du gène de la globine au cours du développement est contrôlée par des séquences régulatrices très éloignées des régions codantes

Un autre type de cellule sanguine, l'érythrocyte, permet de voir en détail comment la production d'une protéine cellule-spécifique, ici l'hémoglobine, est régulée au sein d'une lignée cellulaire. La principale caractéristique de la différenciation des érythrocytes est la synthèse d'une importante quantité d'hémoglobine. Toute l'hémoglobine présente dans un érythrocyte totalement différencié est produite avant sa différenciation terminale. Chez les mammifères, les érythrocytes totalement différenciés perdent leur noyau. Chez les oiseaux, le noyau est conservé mais il est transcriptionnellement inactif.

L'hémoglobine des vertébrés est un tétramère constitué de deux globines α et deux globines β , identiques deux à deux. Sa synthèse implique donc la régulation coordonnée de deux gènes différents de globine. Les gènes codant la globine α et la globine β appartiennent à des familles multigéniques différentes. Chaque famille est constituée d'un complexe génique, et les deux familles sont localisées sur deux chromosomes différents. Chez les mammifères, les membres de chaque famille exprimés à différents stades de développement ne sont pas les mêmes et des hémoglobines distinctes sont produites lors de la vie embryonnaire, fœtale ou adulte. Cette modification permet d'adapter le transport d'oxygène aux conditions de vie du stade de développement. L'hémoglobine humaine fœtale, par exemple, a une affinité pour l'oxygène plus forte que l'hémoglobine adulte : elle est capable de prendre en charge de façon efficace l'oxygène apporté par l'hémoglobine maternelle au niveau du placenta ; cette hémoglobine maternelle est, quant à elle, suffisamment affine pour se charger en oxygène dans les poumons, un environnement riche en ce gaz. L'exemple des gènes des globines β illustrera le cas des gènes à l'expression non seulement cellule-spécifique mais aussi régulée au cours du développement.

Le complexe de gènes de la β -globine humaine contient cinq gènes, ϵ , γ_{c} , γ_{A} , δ , et β (Fig. 8.17). Ils sont exprimés à différents moments du développement : ϵ dans l'embryon précoce, au niveau de la vésicule vitelline ; les deux gènes γ , qui codent des protéines différant par un seul acide aminé, dans le foie fœtal ; les gènes δ et β , dans les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse adulte. À chacun de ces stades du développement, les protéines produites par ces gènes s'associent avec des globines issues de l'expression d'un gène du complexe α -globine pour former des hémoglobines physiologiquement différentes (voir Fig. 8.17).

Des mutations dans les gènes de globine sont à l'origine de nombreuses maladies sanguines héréditaires relativement communes. L'une d'elles, l'anémie falciforme, est due à une mutation ponctuelle dans le gène de la β -globine. Chez les individus



Fig. 8.17 Les gènes de la globine humaine. L'hémoglobine humaine est constituée de quatre sous-unités identiques deux à deux : deux globines de type α et deux globines de type β , codées repectivement par l'un des gènes des familles α et β situées respectivement sur les chromosomes 16 et 11. La nature des sousunités change au cours du développement. Chez l'embryon, l'hémoglobine est constituée de sous-unités ζ (type α) et ε (type β). Le foie fœtal assemble des sous-unités α et γ . Chez l'adulte, l'hémoglobine est majoritairement constituée par des sous-unités α et β , mais une faible portion est constituée de sousunités α et δ . Les régions α -RCL et β -RCL sont des régions de contrôle du locus impliquées dans l'activation des différents gènes globine au cours du temps.

homozygotes pour la mutation, les molécules d'hémoglobine anormales s'agrègent sous forme de fibres et déforment les cellules qui prennent un aspect caractéristique en faucille. Ces cellules ne peuvent plus passer facilement dans les capillaires sanguins et les bouchent, provoquant de nombreux symptômes de cette maladie. Elles ont aussi une durée de vie plus courte que les érythrocytes normaux. L'ensemble provoque une anémie par manque d'érythrocytes fonctionnels. L'anémie falciforme est l'une des rares maladies génétiques où le lien entre une mutation et l'effet sur la santé est bien compris.

Les régions régulatrices de l'expression génique sont souvent très complexes et étendues et ceci est souligné avec l'exemple de la β -globine. Chaque gène du complexe possède un promoteur et des sites de contrôle immédiatement en amont (côté 5') du point « start » de transcription. Il existe également un *enhancer* en aval (côté 3') du gène globine β , qui est le dernier gène du complexe (Fig. 8.18). L'expression ce gène dépend principalement du facteur de transcription GATA1, qui a de nombreux sites de liaison dans la région de contrôle du gène. Mais ces séquences locales de contrôle, contenant des sites de liaison pour des facteurs permettant la différenciation des cellules érythroïdes et pour des facteurs plus génériques ne sont pas suffisantes pour une régulation correcte de l'expression des gènes de la β -globine. Comme dans les autres cas, une combinaison de signaux est nécessaire.





Fig. 8.19 Un mécanisme possible de l'activation successive des gènes de la famille β -globine par la RCL au cours du développement. Au cours du développement, la RCL établirait des contacts avec le promoteur de chacun des gènes successifs, contrôlant ainsi leur expression temporelle.

Illustration d'après Crossley, M., Orkin, S.H. : **Regulation of the** β -globin locus. Curr. Opin. Genet. Dev. 1993, **3** : 232-237.



L'originalité fascinante de ce système est l'activation et l'inactivation successives des différents gènes de globine. Cette expression régulée au cours du développement du complexe β -globine dépend d'une région très en amont du gène ϵ . Cette **région de contrôle du locus** (RCL, voir Fig. 8.18) s'étend sur 10 000 paires de bases situées à environ 5 000 paires de bases en amont de l'extrémité 5' du gène ϵ . La RCL confère un niveau d'expression élevé à tout gène de la famille globine qui lui est lié. Elle est aussi impliquée dans le contrôle de la séquence temporelle d'expression de l'ensemble du complexe β -globine, même si le gène β de la globine lui-même, par exemple, est situé à environ 50 000 paires de bases de l'extrémité 5' de la RCL. Une région de contrôle analogue existe en amont du complexe α -globine (voir Fig. 8.17)

Un modèle intéressant propose que ce contrôle de l'expression des gènes globine passe par une interaction entre des protéines liées au RCL et des protéines liées aux promoteurs des gènes successifs de globine (Fig. 8.19). L'ADN formerait localement une boucle telle que ces deux groupes de protéines pourraient interagir physiquement. Ainsi, la RCL interagirait successivement avec le promoteur du gène ε dans les précurseurs des érythrocytes de la vésicule vitelline embryonnaire, avec les promoteurs des gènes γ dans le foie fœtal, et avec le promoteur du gène β dans la moelle osseuse adulte. L'un des mécanismes proposés suppose que la RCL du complexe β -globine active la transcription en amenant au gène concerné des complexes centraux de transcription pré-assemblés. Ceux-ci sont ensuite activés au niveau du gène et la transcription peut ainsi commencer.

8.10 L'épiderme de la peau des mammifères adultes est continuellement remplacé par des cellules issues de cellules souches

L'épiderme de la peau est en contact permanent avec un environnement externe abrasif. En continu, il perd un grand nombre de cellules par sa surface et, comme le sang, il doit être constamment renouvelé. Cette tâche est menée à bien par des cellules souches tissu-spécifiques, incluses à la base de l'épiderme et sources d'un apport continu de nouvelles cellules.

La peau des mammifères est constituée de deux couches tissulaires : le **derme**, qui contient principalement des fibroblastes et l'épiderme, couche externe protectrice essentiellement formée de cellules remplies de kératine, les **kératinocytes**. C'est l'épiderme, renouvelé à partir de cellules souches, qui est ici l'objet d'un intérêt. Les altérations du derme sont réparées par une prolifération des fibroblastes et une nouvelle croissance des vaisseaux sanguins endommagés. Une matrice extracellulaire de type **lame basale** sépare l'épiderme du derme. L'épiderme est un épithélium pluristratifié, et les multiples couches de kératinocytes protègent les tissus internes des agressions de l'environnement en formant une barrière résistante, étanche et résiliente (Fig. 8.20). Des glandes sudoripares, des follicules pileux régulièrement espacés et accompagnés de glandes sébacées sont associés à l'épiderme. Entre les poils, l'épiderme est qualifié d'épiderme interfolliculaire. Les cellules de la surface externe de l'épiderme sont constamment éliminées et doivent être remplacées (l'épiderme est totalement renouvelé en quatre semaines). Les nouvelles cellules de l'épiderme



Fig. 8.20 Coupe transversale de peau humaine. La peau est constituée d'un épiderme externe (orange pâle) séparé du derme sous-jacent par une lame basale. Les structures d'origine épidermique sont de la même couleur, les structures dermiques sont en gris. Les localisations des cellules souches sont indiquées en rouge. En cas de blessure, les cellules souches de la base du follicule pileux et de la glande sébacée peuvent migrer et contribuer à la formation d'une nouvelle couche basale.

interfolliculaire sont produites tout au long de la vie par la différenciation de cellules souches situées dans la **couche basale** de l'épiderme, au contact de la lame basale. Chaque poil a son propre système de renouvellement : des cellules souches sont présentes à la base de chaque follicule.

La prolifération des cellules de la couche basale dépend de stimuli fournis par les fibroblastes dermiques et par les molécules extracellulaires de la lame basale. La niche des cellules souches épidermiques est donc constituée de la lame basale et du derme. Lorsqu'une cellule quitte cette niche, elle s'engage dans une différenciation, qui se finalise après sa sortie de la couche basale, et qui aboutit à la formation de kératinocytes formant la couche kératinisée externe, protectrice de l'épiderme (Fig. 8.21). Dans l'épiderme interfolliculaire, les kératinocytes sont progressivement poussés vers la surface au cours de leur maturation. Lorsqu'ils sont dans la couche la plus externe, leur cytoplasme est complètement rempli de kératine, une protéine fibreuse, et leur membrane est renforcée par une protéine, l'involucrine. Enfin, la surface de l'épithélium desquame avec élimination des cellules mortes (voir Fig. 8.21). Dans les glandes sébacées, la différenciation terminale des cellules donne des sébocytes dans lesquels s'accumulent des lipides qui sont libérés à la surface de la peau, suite à la destruction des cellules productrices. La différenciation d'un follicule pileux est bien plus complexe et implique huit lignées cellulaires différentes.

Les kératines sont un élément essentiel du cytosquelette, formant des filaments intermédiaires qui, dans les cellules vivantes de l'épiderme, participent aux jonctions cellules-cellules et donnent à la peau sa résilience et son élasticité. Les cellules de la couche basale produisent les kératines de type 5 et 14. Des mutations dans les gènes codant ces protéines sont responsables d'une forme d'épidermolyse bulleuse, une maladie dans laquelle l'épiderme, qui n'est pas ancré normalement à la lame basale, devient très fragile et forme facilement des cloques. Les cellules épineuses, situées au-dessus de la couche basale, produisent les kératines 1 et 10. Ce changement du type de kératines produites est un indicateur fiable de l'engagement des cellules dans la différenciation terminale (voir Fig. 8.21).

De nombreux signaux régulant ce changement sont actuellement connus. L'activation de la voie Notch dans les cellules de la couche basale promeut leur différenciation. Cette voie est inhibée par des mécanismes variés, dont la voie

Fig. 8.21 Différenciation des

kératinocytes dans l'épiderme humain. Les descendants des cellules de la couche basale qui deviendront les kératinocytes de l'épiderme, se détachent de la lame basale, se divisent de nombreuses fois et quittent la couche basale avant d'entamer leur différenciation. Les cellules de la couche basale produisent des filaments intermédiaires de kératines 14 et 5 et l'intégrine $\alpha_{s}\beta_{u}$ nécessaire à la formation des hémidesmosomes et à l'adhérence à la lame basale. La différenciation en kératinocytes implique une perte d'expression de l'intégrine et s'accompagne d'un changement d'expression des gènes de kératine, les kératines 1 et 10 étant produites en grandes quantités. Dans les couches intermédiaires, les cellules sont encore grandes et métaboliquement actives alors que dans les couches les plus externes de l'épiderme, les cellules perdent leur noyau et sont remplies de filaments de kératine, et qu'un dépôt de la protéine involucrine rend leur structure membranaire insoluble. Enfin, les cellules mortes sont éliminées de la surface de la peau.



du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR pour *Epidermal Growth Factor Receptor*) qui maintient donc ces cellules dans la couche basale. Le derme produit Wnt dont l'action sur les cellules de la couche basale contribue à l'inhibition de la différenciation (voir Fig. 8.21). Les molécules d'adhérence cellulaire ont aussi un rôle important. La couche basale est ancrée sur la lame basale par des jonctions spécialisées contenant des intégrines, les hémidesmosomes (voir Encart 9A). Les cellules de la couche basale expriment à leur surface l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, nécessaire à la formation des hémidesmosomes, qui interagit avec le collagène et la laminine de la matrice extracellulaire (certaines épidermolyses bulleuses sont associées à des mutations du collagène impliqué dans les hémidesmosomes). Ces cellules peuvent aussi exprimer l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, un récepteur de la laminine. L'activation de Notch provoque une diminution de la quantité d'intégrine présente à la surface cellulaire, ce qui permet à la cellule de se détacher de la lame basale.

L'épiderme interfolliculaire peut aussi être généré à partir du follicule pileux, où des cellules souches ont été localisées dans le bulbe pileux (voir Fig. 8.20). Des expériences de suivi de lignage cellulaire utilisant des souris transgéniques dans lesquelles, par exemple, la GFP (pour *Green Fluorescent Protein*) est produite sous le contrôle du promoteur du gène de la kératine 5, ont montré que les cellules à l'origine de nouveaux follicules provenaient du bulbe et que, dans certaines conditions, par exemple une blessure, ces cellules peuvent aussi participer à la formation des glandes sébacées et de l'épiderme. Mises en culture en présence de fibroblastes dermiques, des cellules isolées du bulbe peuvent chacune donner des follicules pileux, des glandes sébacées et de l'épiderme, utilisables lors de greffe de peau. Ces expériences montrent que l'épiderme de souris contient différentes populations de cellules souches qui peuvent être recrutées en cas de besoin. Elles suggèrent aussi l'existence de différentes modalités de division de ces cellules souches.

8.11 Les cellules souches utilisent différentes modalités de division pour entretenir les tissus

L'identification exacte des cellules souches dans la couche basale de l'épiderme n'est pas réalisée et la question de savoir si toute cellule de cette couche peut, au moins dans certaines circonstances, comme une blessure, réagir comme une cellule souche n'est pas résolue. Les cellules de la couche basale sont hétérogènes, certaines





Fig. 8.22 Différents modes de division des cellules souches contribuent à l'homéostasie tissulaire. Dans le modèle « classique », la cellule souche (en rouge) se divise toujours asymétriquement, donnant une cellule souche et une « cellule d'amplification transitoire » (en orange) programmée pour se diviser de nombreuses fois puis se différencier (en bleu). Dans le modèle d'asymétrie populationnelle, un progéniteur (en vert) peut se diviser selon trois modes, comme indiqué. Dans le modèle hybride, des cellules souches à cycle de division très lent, avec seulement quelques divisions par an, produisent des progéniteurs qui se divisent bien plus rapidement en suivant les règles de l'asymétrie populationnelle, ce qui permet de renouveler l'épiderme. Pour maintenir l'homéostasie tissulaire,

la proportion de chaque type de division doit être correctement équilibrée. En particulier, les divisions symétriques doivent se produire en proportions égales. Ainsi, si une cellule souche (S) peut subir des divisions de type S + S, D + D ou S + D, où D est une cellule engagée dans la différenciation, alors tant que le nombre de division de type S + S est égal au nombre de D + D, le système restera à taille constante. Les pourcentages indiqués sur la figure représentent la probabilité que la division concernée se produise dans une population de cellules.

Source : Mascré, G., et al. : Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. Nature 2012, 489 : 257-262.

proliférant rapidement alors que d'autres se divisent rarement. Il a été suggéré que les cellules à cycle lent soient les cellules souches et que les cellules en multiplication rapide qui les entourent, dénommées **cellules d'amplification transitoire** ou parfois cellules progénitrices, soient engagées dans la voie de différenciation terminale. Ces hypothèses suivent le modèle classique de division asymétrique invariante des cellules souches. Chaque division d'une cellule souche donne une cellule restant souche et une cellule qui s'engage dans la différenciation, en commençant par se multiplier un nombre fini de fois avant la différenciation terminale (Fig. 8.22).

Cependant, le suivi individuel du devenir de cellules de la couche basale a démontré une prolifération continue de ces cellules dans certaines parties de l'épiderme, suggérant que toutes ces cellules pourraient être identiques et se comporter en progéniteurs plutôt qu'en cellules souches classiques. Ces observations ont permis de proposer des modèles dans lesquels la division des cellules de la couche basale est symétrique ou asymétrique, la proportion de ces différents types de division permettant de maintenir la balance entre cellules souches/progéniteurs et cellules différenciées, assurant ainsi l'homéostasie tissulaire (voir Fig. 8.22). Selon le modèle de l'**asymétrie populationnelle**, les cellules de la couche basale sont des progéniteurs qui peuvent se diviser selon trois façons : soit se diviser symétriquement pour donner deux cellules qui resteront des progéniteurs, soit symétriquement pour donner deux cellules qui se différencieront, soit asymétriquement pour donner une cellule de chaque type comme dans le modèle classique (voir Fig. 8.22). Dans ce type de renouvellement tissulaire, il n'y a pas besoin de phase d'amplification car les progéniteurs se divisent continuellement. De plus, tant qu'il y a un équilibre correct entre les trois





Fig. 8.23 Les cellules épithéliales bordant la lumière de l'intestin des mammifères sont continuellement remplacées. En haut sont représentées les villosités, des extensions épithéliales tapissant la paroi de l'intestin grêle ; en bas, un détail d'une crypte et d'une villosité. Les cellules souches assurant le renouvellement de l'épithélium intestinal se trouvent à la base des cryptes. Un premier type de cellules souches (en jaune) est caractérisé par un taux de division faible et les cellules sont situées à distance faible du fond de la crypte. Les cellules souches du second type (en rouge) sont intercalées entre les cellules de Paneth dans la base des cryptes ; elles se divisent plus fréquemment que les cellules du premier type et sont la principale source des nouvelles cellules assurant en routine un renouvellement de l'épithélium. Les cellules souches donnent des cellules qui prolifèrent, repoussées vers la villosité et qui, lorsqu'elles quittent la crypte, sont différenciées en cellules épithéliales de types variés. Le mouvement continue vers l'extrémité de la villosité au niveau de laquelle les cellules seront au final éliminées. La durée totale du déplacement est de l'ordre de 4 jours. La photographie montre une coupe d'intestin grêle de souris. Les cellules souches dans la base de la crypte étaient initialement marquées individuellement en différentes couleurs. Les cryptes apparaissaient au début du renouvellement comme un mélange de clones de cellules souches (non illustré). Mais avec le temps, la compétition entre les différents clones (voir Fig. 8.22) fait que chaque crypte est finalement peuplée par les descendants d'une seule cellule souche, ce qui est montré ici.

D'après Snippert, H.J., et al. : Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. Cell 2010, **143** : 134-144.

types de division, le tissu est entretenu. Toutefois, le modèle de l'asymétrie populationnelle ne prend pas en compte la présence de cellules à cycle lent dans la couche basale épidermique. Une analyse de l'ensemble imposant des données expérimentales et des observations disponibles suggère qu'un modèle hybride, dans lequel des cellules souches classiques (les cellules à cycle lent) produisent des progéniteurs qui prolifèrent et se différencient selon les règles de l'asymétrie populationnelle, est le plus approprié pour rendre compte de la dynamique de renouvellement de l'épiderme.

8.12 Le revêtement intestinal : un autre exemple d'épithélium à renouvellement continu

Comme la couche externe de l'épiderme, l'épithélium tapissant l'intestin est exposé à un environnement relativement hostile (ici, la lumière de l'intestin et son contenu) et subit une perte continue de cellules. Des cellules souches assurent son renouvellement par un processus très similaire à celui que nous avons décrit dans l'épiderme, en particulier en ce qui concerne les molécules de signalisation régulant la différenciation des cellules souches. De même, ces cellules de l'intestin se divisent selon les modes décrits dans la Section 8.11.

Les cellules épithéliales de l'intestin grêle, dérivées de l'endoderme, s'organisent en un épithélium simple qui forme des villosités se projetant dans la lumière de l'intestin et en cryptes s'immisçant dans le conjonctif sous-jacent, dérivé du mésoderme. Des cellules sont éliminées en continu au sommet des villosités cependant que les cellules souches qui permettent leur remplacement sont situées dans la base des cryptes. Les nouvelles cellules générées par les cellules souches sont poussées vers l'extrémité des villosités. En chemin, dans la moitié inférieure des cryptes, elles prolifèrent et constituent une population d'amplification transitoire (Fig. 8.23). La durée de vie des cellules dans l'intestin de mammifère est de l'ordre de 4 jours.

Une crypte de l'intestin grêle de souris contient environ 250 cellules comportant quatre principaux types de cellules différenciées. Trois sont des cellules sécrétrices : les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens, les cellules caliciformes du mucus, et les cellules entéroendocrines des hormones peptidiques. Les entérocytes représentent le quatrième type, largement prédominant dans l'épithélium de l'intestin grêle : ils absorbent les nutriments à partir du contenu intestinal. Environ 150 des cellules d'une crypte sont en prolifération et se divisent deux fois par jours. Chaque crypte produit donc 300 nouvelles cellules par jour. Chaque heure, une douzaine de cellules passent de la crypte à la villosité.

La structure de la base des cryptes est très stéréotypée. Elle contient deux types de cellules souches. Le premier, initialement identifié par son taux de division réduit, est localisé juste au-dessus du fond de la crypte, à la limite de la niche. La niche des



Fig. 8.24 Lignage cellulaire de cellules exprimant *Lgr5* dans l'intestin grêle de souris. Des souris transgéniques exprimant *Lac2* sous contrôle du promoteur de *Lgr5* sont utilisées pour détecter l'origine et le déplacement des cellules exprimant *Lgr.* Les photos montrent la détection par histochimie du produit de l'activité LacZ (cellules bleues) dans l'intestin grêle (a) 1 jour, (b) 5 jours et (c) 60 jours après induction.

D'après Barker, N., et al. : Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature 2007, 449 : 1003-1007.

cellules souches est composée des cellules épithéliales formant la base de la crypte et des cellules mésenchymateuses qui les entourent. Les cellules souches du second type sont bien plus prolifératives, et sont des cellules cylindriques minces (4 à 6 par crypte) intercalées entre les cellules de Paneth au fond de la crypte (voir Fig. 8.23). Les deux types de cellules souches ont des profils d'expression génique différents. Les cellules en division lente produisent en abondance Bmi1, un constituant du complexe protéique Polycomb qui se lie à la chromatine. Un marquage de lignage à long terme des cellules exprimant le gène Bmil chez des souris transgéniques, en utilisant LacZ comme marqueur, a permis de constater que certaines cryptes et villosités sont entièrement marquées après 12 mois, montrant que les cellules exprimant Bmi1 sont des cellules souches multipotentes. L'autre population de cellules souches exprime une cible de Wnt, le gène codant Lgr5, un récepteur couplé aux protéines G dont le ligand est inconnu. Le même type de marquage de lignage appliqué aux cellules exprimant Lgr5 a montré qu'une seule de ces cellules peut reconstituer en deux mois une crypte entière et des rubans de cellules dans les villosités adjacentes (Fig. 8.24). Comme les cellules à cycle lent, les cellules cylindriques exprimant Lgr5 sont des cellules souches multipotentes. La différence de fonction ou d'implication dans l'entretien du revêtement intestinal de ces deux types de cellules souches n'est pas claire. Il a été suggéré que l'un serait responsable de l'homéostasie tissulaire normale alors que l'autre fournirait une réserve de cellules souches en cas de régénération mais, expérimentalement, ils sont interconvertibles pour ces fonctions. Si toutes les cellules exprimant Lgr5 sont éliminées, les cellules exprimant Bmi1 régénèrent cette population et contribuent à l'entretien de la crypte.

La multipotence des cellules souches exprimant *Lgr5* a été confirmée en culture clonale *in vitro*. Dans de bonnes conditions de culture, une cellule isolée exprimant *Lgr5* peut donner naissance à un organoïde comportant des cryptes et villosités organisées et contenant les quatre types de cellules différenciées.

La voie de signalisation Notch, activée par les cellules de la niche au niveau des cryptes de l'intestin grêle, est impliquée dans la détermination des cellules proliférantes en cellules sécrétrices ou absorbantes. Dans des conditions où la signalisation Notch est réduite, les cellules proliférantes se différencient toutes en cellules caliciformes, alors que l'activation de cette voie augmente la prolifération des cellules souches et diminue sévèrement le nombre des cellules sécrétrices différenciées.

L'entretien des cellules souches est sous le contrôle des mêmes signaux dans l'épiderme et dans l'intestin grêle. Dans les deux cas, la voie Wnt/ β -caténine favorise l'auto-renouvellement des cellules souches et BMP l'inhibe. Certaines populations de cellules souches localisées dans des sites particuliers peuvent être maintenues quiescentes sous l'action de BMP et avec inhibition de la voie Wnt, alors que la prolifération d'autres cellules est activée par la voie Wnt en présence d'antagonistes de BMP (Fig. 8.25). Dans l'épiderme et dans l'intestin, Notch est nécessaire à la différenciation des cellules souches. Ces interactions entre les voies Wnt, BMP et Notch ont également été impliquées dans le maintien et la différenciation d'autres types de cellules souches adultes. Leur importance dans le contrôle des populations de cellules souches est soulignée par la fréquence des mutations touchant les éléments de ces voies de signalisation dans de nombreux types de cancers. **Fig. 8.25 Signalisation dans la niche des cellules souches.** Certaines voies de signalisation ont des fonctions identiques dans différentes populations de cellules souches. Par exemple, Wnt favorise les divisions et BMP les inhibe dans la peau et dans l'intestin. Des populations de cellules souches sont maintenues quiescentes par l'activité de la voie BMP et l'inhibition de la voie Wnt, ou sont activées sous l'action de la voie Wnt et l'inhibition de la voie BMP par des antagonistes de BMP comme Noggin ou Gremlin,

D'après Li, L., Clevers, H. : Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. Science 2010, **327** : 542-545.



Fig. 8.26 Les cellules satellites

musculaires. Au cours du développement, des précurseurs musculaires exprimant *Pax3* quittent le dermomyotome et migrent dans les membres. Dans ces derniers après la naissance, les cellules souches musculaires restent associées aux muscles en tant que cellules satellites, mais expriment *Pax7*.



8.13 Les cellules musculaires squelettiques et les cellules nerveuses peuvent être renouvelées à partir de cellules souches chez l'adulte.

Des blessures peuvent altérer les muscles et leur réparation est souvent nécessaire. Pourtant, ces cellules structurellement très différenciées ne se divisent pas. Les mammifères ont une réserve de cellules souches musculaires, les **cellules satellites**. Ces cellules sont associées aux fibres musculaires matures et sont activées en réponse à une blessure. Elles deviennent alors des myoblastes qui prolifèrent et qui se différencient ensuite en nouvelles fibres musculaires (voir Section 8.5).

La population de cellules satellites émerge au cours de la différenciation du muscle squelettique dans l'embryon et génère un réservoir potentiel de tissu musculaire. Ces cellules sont mises à part de la population de myoblastes avant les stades ultimes de différenciation. Ce sont des petites cellules mononucléées emprisonnées entre la lame basale et la membrane plasmique des fibres musculaires matures. Elles peuvent être identifiées par la présence de protéines caractéristiques, comme la protéine membranaire CD34 et le facteur de transcription Pax7 (Fig. 8.26). Chez la souris, les cellules satellites associées à une fibre musculaire (7 cellules en moyenne) peuvent, dans des conditions favorables, après avoir été greffées dans un muscle irradié, générer plus de 100 nouvelles fibres et, de surcroît, s'auto-renouveler. L'irradiation tue les cellules satellites de la souris irradiée : le muscle ne peut pas régénérer par lui-même. Même la transplantation d'une unique cellule satellite dans un muscle irradié permet d'obtenir des fibres musculaires et de nouvelles cellules satellites.

La fonction de Pax7 semble redondante de celle de Pax3. Comme déjà indiqué, Pax3 est essentiel à la détermination précoce des précurseurs musculaires. En revanche, Pax7 est nécessaire à l'entretien de la population de cellules satellites au moment de la naissance. La protéine est détectée dans les muscles adultes. Par contre, si le gène *pax7* est éliminé chez des souris 2 ou 3 semaines après la naissance, la croissance et la régénération des muscles squelettiques des membres ne sont pas modifiées et les cellules satellites peuvent régénérer un nouveau muscle même si elles n'expriment plus ce gène.

Il devient de plus en plus clair que l'existence de cellules souches impliquées dans la vie normale d'un tissu adulte, comme la peau ou l'intestin, ou servant de réservoir mobilisé en cas de blessure, comme dans le muscle, est en fait très répandue. Chaque tissu, chaque organe du corps renferme une population de cellules qui, à la demande, peuvent s'activer et réparer des dommages. C'est aussi vrai, dans une moindre mesure, pour le tissu nerveux. Les modalités de développement des neurones et des autres cellules du système nerveux à partir de cellules souches nerveuses embryonnaires seront décrites Chapitre 12. Cependant, les neurones différenciés ne se divisent
Fig. 8.27 Sites de neurogenèse dans le cerveau adulte de mammifère. La neurogenèse est principalement localisée dans la couche sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe et dans la partie antérieure de la zone sous ventriculaire (ZSV), qui est détaillée ici. Les cellules de la glie radiaire se comportent en cellules souches neurales et génèrent des cellules d'amplification transitoire, qui se différencient en neurones. Les nouveaux neurones produits dans le gyrus denté migrent dans la zone granulaire, ceux qui sont issus de la ZSV migrent vers le bulbe olfactif et se différencient en interneurones. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins fournissent aussi des signaux favorisant la différenciation (non illustré).

Illustration d'après Taupin, P. : Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system : functionality and potential clinical interest. Med. Sci. Monit. 2005, *11* : 247-252.

pas dans le cerveau des mammifères et, pendant de nombreuses années, la production de nouveaux neurones, ou **neurogenèse**, était considérée comme inexistante chez les mammifères adultes, bien qu'elle ait été démontrée dans le cerveau adulte d'oiseaux, de reptiles, d'amphibiens et de poissons. Récemment, il a été prouvé que la neurogenèse est en fait un phénomène normal dans le cerveau de mammifère adulte et des cellules souches neurales, capables de générer des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes en culture ont été identifiées.

Ces cellules souches neurales adultes, au moins chez les rongeurs adultes, sont des cellules de la glie radiaire qui se divisent lentement, comme les cellules du cortex embryonnaire produisant les neurones. Chez les mammifères adultes, la neurogenèse n'existe que dans deux régions : la zone sous-ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. Les neurones issus de la ZSV migrent et se différencient en interneurones du bulbe olfactif. Les cellules souches de l'hippocampe génèrent de nouveaux neurones dans la couche granulaire du gyrus denté. Les cellules de la glie radiaire, à prolifération lente et qui expriment des marqueurs d'astrocytes, se comportent en cellules souches neurales adultes. Dans la ZSV, elles donnent naissance à des cellules d'amplification transitoire qui prolifèrent puis évoluent en progéniteurs neuraux (Fig. 8.27) alors que dans l'hippocampe, les cellules de la glie radiaire donnent plus directement des neurones. D'autres cellules gliales situées à proximité fournissent une niche, produisant des signaux qui contrôlent le comportement des cellules souches. La voie Wnt/β-caténine joue un rôle important dans la régulation de la neurogenèse adulte. La signalisation Notch détermine le nombre de cellules souches et régule la signalisation Sonic hedgehog, qui favorise leur survie. Les cellules épendymaires qui bordent le ventricule, les vaisseaux sanguins et le sang lui-même constituent d'autres sources de signaux dans le cerveau adulte.

Pendant longtemps, les preuves de la neurogenèse adulte dans l'espèce humaine sont restées rares et controversées. Cependant, une étude ingénieuse a confirmé que de nouveaux neurones sont bien produits dans l'hippocampe, de manière importante, (le nombre de 1 400 par jour a été avancé) et tout au long de la vie. Elle a exploité le fait que les essais atomiques des années 1950-1960 ont causé un pic de ¹⁴C atmosphérique. Ce carbone, entré dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire des plantes, a pu être incorporé dans les neurones générés, fournissant ainsi une sorte de pulse « naturel » qui peut être exploité comme un marqueur raisonnablement précis de l'époque de naissance du neurone. L'hippocampe est une partie du cortex très impliquée dans les phénomènes de mémoire (acquisition et stockage). Il est tentant d'attribuer une signification fonctionnelle de ce type à la persistance de la neurogenèse dans cette région du cerveau.

8.14 Les cellules souches embryonnaires prolifèrent, peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires en culture et contribuent au développement normal *in vivo*

Les cellules souches multipotentes responsables du renouvellement tissulaire chez l'adulte peuvent donner un nombre limité de types cellulaires différents. De plus, l'entretien de leur état de cellule souche nécessite une niche spécifique, comme le stroma de la moelle osseuse qui soutient les cellules souches hématopoïétiques (voir



Section 8.7) ou la lame basale et les cellules du derme sous-jacent dans le cas des cellules souches épidermiques (voir Fig. 8.21). Mais il existe dans l'embryon précoce des cellules embryonnaires pluripotentes qui peuvent se différencier en des types cellulaires des trois feuillets embryonnaires et n'ont pas besoin d'une niche particulière.

Les cellules souches pluripotentes des embryons de mammifères sont les **cellules souches embryonnaires** (ou **cellules ES** pour *Embryonic Stem cells*). Ces cellules sont obtenues à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste. Isolées en culture clonale, les cellules ES de souris peuvent ensuite être cultivées pendant très longtemps, apparemment indéfiniment. Si elles sont injectées dans un blastocyste qui est ensuite réimplanté *in utero*, elles peuvent participer à la construction de tous les tissus au sein de l'embryon, mais pas aux structures extra-embryonnaires. Ce type d'expérience a montré que deux ou trois cellules ES peuvent constituer un embryon complet.

Entre autres propriétés utiles, les cellules ES de souris cultivées *in vitro* peuvent donner un grand nombre de cellules souches pluripotentes de génotype connu, utilisables dans des expériences. Par exemple, les cellules ES dérivées de souris utilisées comme modèles d'une maladie humaine peuvent être induites à se différencier dans le type cellulaire affecté par cette maladie. Les cellules ainsi obtenues constituent un remarquable matériel expérimental.

L'entretien de cellules ES en culture nécessite du sérum et le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF pour *Leukemia Inhibitory Factor*) qui inhibe la différenciation (Encart 8B). BMP-4 est le constituant particulier du sérum qui complète l'action de LIF dans l'entretien de la pluripotentialité. Des études ont révélé un ensemble restreint de facteurs de transcription agissant en aval de LIF et BMP-4, et nécessaires au maintien de la pluripotentialité des cellules ES. Il s'agit de Nanog, Oct 3/4, Sox 2, Esrrb et Kfl4. Certains d'entre eux, dont Nanog, ont une expression restreinte aux cellules souches pluripotentes. Cultivées en présence de LIF et BMP-4, les cellules ES semblent cependant prêtes à se différencier, comme l'indique l'existence au niveau de la chromatine de traces d'activation et de répression (voir Encart 8A), présentes au niveau des régions régulatrices de la plupart des gènes exprimés dans les cellules ES, et qui deviennent des ensembles de marques caractéristiques d'un type cellulaire donné lorsque des signaux de différenciation provoquent l'activation ou l'inactivation de ces gènes.

La principale fonction des facteurs de transcription impliqués dans la pluripotentialité est d'empêcher la différenciation. Ils réalisent cette fonction en entretenant mutuellement leur expression et en supprimant l'expression des gènes de différenciation. C'est pourquoi la perte de fonction de l'un d'entre eux ne se traduit pas par la mort de la cellule, mais par sa différenciation dans un type cellulaire particulier. L'expression des facteurs de pluripotentialité est fluctuante dans les cellules en culture, et c'est peut-être pourquoi les cultures de cellules ES sont très hétérogènes en termes d'expression génique et contiennent toujours une fraction de cellules en différenciation. Ces propriétés reflètent l'origine des cellules ES dans l'embryon qui exprime aussi les facteurs de pluripotentialité, mais où la pluripotentialité est un stade transitoire. Dans des conditions de culture « 2i », qui suppriment la différenciation (voir Encart 8B), cette hétérogénéité est supprimée.

En dehors de la masse cellulaire interne, un embryon de souris présente avant l'implantation deux autres types de cellules, l'endoderme primitif et le trophectoderme, qui donnent dans les conditions normales des tissus extra-embryonnaires (voir Fig. 5.6). En culture, il est possible de convertir ces cellules en cellules souches capables d'auto-renouvellement, mais qui ne peuvent donner, en se différenciant, que leur habituel type cellulaire. Ces cellules sont dites cellules souches lignée-spécifiques.

Les premières cellules ES humaines ont été produites en 1998. Elles expriment les mêmes facteurs de transcription que les cellules ES de souris, mais les voies de signalisation responsables de l'auto-entretien des cellules sont différentes. Dans les cellules ES humaines, les signalisations FGF et activine/Nodal, mais pas LIF, sont nécessaires à la maintenance des cellules ES humaines et la signalisation BMP promeut la différenciation, alors que c'est l'inverse chez la souris. Ces différences ont été partiellement expliquées par la découverte chez la souris, que les cellules souches peuvent aussi provenir de l'épiblaste à 5 jours, un stade beaucoup plus tardif que le blastocyste

ENCART 8B L'isolement et la culture de cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES)

Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) de souris peuvent être obtenues par la culture *in vitro* de blastocystes. Les conditions utilisées (présence de sérum et d'une cytokine, le facteur inhibiteur de leucémie ou LIF pour *Leukemia-Inhibiting Factor*), permettent l'émergence en quelques jours de colonies d'origine clonale qui peuvent être entretenues en culture sans signe de différenciation. Une technique plus récente, et très efficace, remplace le sérum par des inhibiteurs des protéines kinases MAPK et



Figure 1

GSK3 (« condition 2i »), deux molécules impliquées dans la différenciation (Figure 1). La condition 2i a été utilisée pour obtenir des cellules ES à partir de blastocystes de souris et de rat, et pourrait devenir une approche générale efficace dans de nombreuses espèces. Lorsque LIF ou les inhibiteurs des voies de signalisation sont retirés du milieu de culture, les cellules ES peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires et tissus variés sous l'effet de différents cocktails de facteurs de croissance et de conditions de culture élaborées dans ce but (voir Section 8.14)

Pour savoir si les cellules ES en culture sont réellement pluripotentes et peuvent assurer un développement complet, elles sont injectées dans un blastocyste hôte, fourni par une lignée de souris génétiquement différente, pour produire un blastocyste chimérique qui est réimplanté dans une souris porteuse. Le développement de cette chimère en un adulte fertile est considéré comme une preuve de la pluripotentialité des cellules ES introduites. Une autre approche est la méthode de chimère tétraploïde, qui consiste à utiliser un blastocyste hôte tétraploïde, formé *in vitro*, par la fusion des blastomères d'un embryon au stade deux cellules. Les cellules tétraploïdes ne participent qu'à la construction du placenta et l'embryon ne dérive donc que des cellules ES.

(voir Fig. 3.23). Ces **cellules souches épiblastiques (epiSCs** pour *epiblast Stem Cells*) ont, chez la souris à 5 jours, les mêmes propriétés que les cellules ES en ce qui concerne leur faculté à se différencier en une large gamme de tissus, et par la nature des facteurs de transcription qu'elles produisent. Mais contrairement aux cellules ES, elles ne peuvent pas générer de chimères lorsqu'elles sont injectées dans des blastocystes avant implantation (Fig. 8.28)

En culture, les cellules epiSC de souris ont les mêmes besoins que les cellules ES humaines et il a été suggéré que ces dernières leur ressemblaient plus que les cellules ES de souris. Plusieurs centaines de lignées de cellules ES humaines sont actuellement disponibles et il serait intéressant de savoir si des cellules présentant toutes les caractéristiques des cellules ES de souris peuvent être obtenues à partir de ces lignées, ou si elles ont toutes les mêmes limitations que les cellules epiSC de souris. Il est bien sûr impossible de faire un test utilisant une chimère avec les cellules ES humaines.

En culture, la différenciation des cellules ES murines ou humaines peut être orientée vers des types cellulaires particuliers. Cette différenciation suit le patron du développement embryonnaire et, lorsqu'elles quittent l'état pluripotent, les cellules ES sont face au choix d'une destinée neuroectodermique ou mésodermique. La voie choisie dépend des facteurs de croissance présents dans le milieu de culture, qui sont sélectionnés pour mimer la situation présente *in vivo* (voir Chapitre 4). En absence de sérum, les cellules ES se différencient en cellules nerveuses. Ce processus est facilité par la suppression de signaux comme activine/Nodal, BMP ou Wnt, qui favorisent la différenciation en dérivés endodermiques et mésodermiques comme le cœur, les muscles somatiques, les îlots sanguins, les cellules adipeuses, les macrophages ou même les cellules germinales (voir Encart 8B). Des types particuliers de neurones peuvent être obtenus à partir de cellules souches neurales issues de cellules ES, ce qui revêt un intérêt médical pour d'éventuelles applications thérapeutiques.



Si le choix initial (neuroectoderme *versus* mésendoderme) est simple, la différenciation en types cellulaires spécifiques exige des modifications minutieuses de composition du milieu de culture au cours du temps. Par exemple, des agrégats de cellules ES traités successivement par des combinaisons particulières de FGF-2, EGF et PDGF continuent à proliférer tant que ces facteurs de croissance sont présents. Après leur retrait, les cellules se différencient en l'un des deux types de cellules gliales, en astrocytes ou en oligodendrocytes.

RÉSUMÉ

La différenciation cellulaire est contrôlée par des combinaisons complexes de facteurs de transcription dont la synthèse et l'activité sont influencées et guidées au cours du temps par des signaux externes. Certains facteurs de transcription sont communs à de nombreux types cellulaires, d'autres ont un profil d'expression très restreint. Les combinaisons de ces facteurs définissent les types de cellules différenciées. La différenciation musculaire, par exemple, peut être déclenchée par des facteurs de transcription spécifiques de la lignée musculaire, comme MyoD, qui se lient aux régions de contrôle de gènes spécifiques du muscle.

De nombreux tissus adultes, comme le sang, l'épiderme ou l'épithélium intestinal sont continuellement remplacés grâce à la différenciation de nouvelles cellules à partir de cellules souches. L'hématopoïèse montre comment une cellule unique, la cellule souche multipotente, peut à la fois s'auto-renouveler et générer un ensemble de types cellulaires différents. La différenciation de ces lignées de cellules sanguines variées dépend surtout de signaux externes bien qu'il semble exister une tendance intrinsèque à la diversification. En revanche, les signaux externes sont essentiels pour la survie et

Fig. 8.28 Comparaison des cellules ES de souris, des cellules souches de l'épiblaste (epiSCs) de souris et des cellules ES humaines. : différents types de cellules souches et leurs propriétés. Les cellules ES humaines ressemblent plus aux cellules epiSCs de souris, ce qui suggère qu'elles sont à un stade de développement plus avancé que les cellules ES de souris. la prolifération des différents types cellulaires. L'obtention de cellules sanguines à partir de cellules souches multipotentes implique des restrictions successives du potentiel de différenciation qui accompagnent l'engagement dans les différentes lignées.

Dans tous ces cas, les cellules souches adultes sont multipotentes (et non pluripotentes) : elles ne génèrent que les types cellulaires spécialisés présents dans un tissu donné. Les cellules souches embryonnaires sont dérivées des blastocystes de mammifères et sont pluripotentes : elles ont la capacité de se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme. Leur différenciation en culture peut être dirigée dans une voie particulière en contrôlant les signaux auxquels elles sont exposées. Ces cellules sont donc un outil prometteur pour la médecine régénérative.



La plasticité de l'état différencié

Jusqu'ici des exemples de gènes allumés ou éteints au cours du développement ont été étudiés et certains des mécanismes impliqués ont été considérés. Ceux-ci sont principalement la liaison de différentes combinaisons de protéines de régulation génique sur les régions de contrôle des gènes, ainsi que les modifications épigénétiques de la chromatine qui rendent des gènes silencieux sur le long terme. Ces changements sont-ils réversibles et, en conséquence, l'état différencié l'est-il aussi ? De nombreux exemples de cellules souches adultes naturellement multipotentes, qui peuvent à la fois s'auto-renouveler et générer un ensemble de types cellulaires différents ont été décrits. Si ces cellules souches pouvaient être produites de façon fiable et en quantité suffisante, il deviendrait possible de les utiliser pour remplacer des cellules endommagées ou perdues lors de maladies ou de blessures. C'est l'un des enjeux majeurs de la **médecine régénérative**. L'utilisation thérapeutique de cellules souches dépend de la maîtrise du contrôle de l'activité génique, qui permet d'obtenir le type cellulaire voulu, mais aussi de la plasticité des cellules souches. Par exemple, une cellule souche sanguine peut-elle donner un neurone dans des conditions appropriées ? Est-il facile de modifier le patron d'expression génique ? Est-il possible de générer des cellules pluripotentes à partir de cellules différenciées ?



Fig. 8.29 Transfert de noyau. Le noyau haploïde d'un ovocyte de xénope non fécondé est détruit par un traitement aux ultra-violets. Un noyau diploïde issu d'une cellule épithéliale intestinale de têtard ou d'une culture de peau adulte est transféré dans l'œuf énucléé. Le développement se passe normalement au moins jusqu'au stade têtard.

Tout d'abord va être examiné dans quelle mesure le profil d'activité génique des cellules différenciées peut revenir vers celui d'un zygote. Un moyen simple de tester si cette réversion est possible, est de placer le noyau d'une cellule différenciée dans un environnement cytoplasmique différent, contenant donc un jeu différent de protéines régulatrices.

8.15 Les noyaux de cellules différenciées peuvent orchestrer un développement

Les expériences les plus spectaculaires testant la réversibilité de l'état différencié ont exploré la capacité des noyaux diploïdes issus de cellules, à différentes étapes du développement, à remplacer le noyau d'un œuf et à permettre un développement normal. Cette capacité avérée indiquerait que la différenciation ne s'accompagne d'aucune modification irréversible du génome. De même, elle montrerait qu'un profil particulier d'activité génique nucléaire est déterminé par les facteurs de transcription et autres protéines régulatrices synthétisées dans le cytoplasme de la cellule. Ce type d'expérience a été tout d'abord tenté en utilisant des œufs d'amphibiens : ils sont gros et particulièrement robustes, donc propices à ce type de manipulation.

Le noyau des œufs non fécondés de xénope est situé juste sous la surface du pôle animal. Une irradiation du pôle animal par des ultraviolets détruit l'ADN dans le noyau, et empêche donc toute fonction nucléaire. Le noyau d'une cellule diploïde pris dans une cellule d'un stade plus tardif du développement peut alors être injecté dans ces œufs énucléés. Les résultats sont remarquables : les noyaux de cellules d'embryon précoce et de certains types de cellules différenciées de la larve et de l'adulte, comme les cellules épithéliales de l'intestin ou de la peau, peuvent remplacer le noyau de l'œuf et permettent le développement d'un embryon jusqu'au stade têtard (Fig. 8.29), et dans quelques cas jusqu'à l'adulte. L'organisme qui en résulte est un **clone** de l'animal qui a fourni le noyau de la cellule somatique, puisqu'ils ont le même génome. Ce procédé est appelé **clonage**. En 2012, le biologiste anglais John Gurdon a reçu un prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour ce travail.

Cette technique de **transfert de noyau de cellule somatique** donne le même résultat avec les noyaux de cellules de peau, de rein, de cœur et de poumon issues d'adultes, et avec les noyaux de cellules du myotome de têtard de xénope. Cependant, le taux de succès obtenu avec les noyaux de cellules somatiques adultes est très faible, seul un faible pourcentage d'œufs transplantés se développant au-delà du stade de la segmentation. En règle générale, plus est avancé le stade de développement de la

cellule somatique d'où provient le noyau, moins celui-ci semble capable de permettre le développement. Les transferts de noyaux provenant d'une blastula réussissent bien mieux. En transplantant des noyaux provenant de blastomères d'une même blastula dans des œufs énucléés différents, il est possible d'obtenir un clone d'animaux génétiquement identiques (Fig. 8.30). Le taux de réussite est encore plus grand si le noyau transféré provient de la blastula d'un embryon cloné. Ces résultats montrent que, au moins pour les types cellulaires testés, les gènes nécessaires au développement ne sont pas modifiés de façon irréversible. Mais surtout, exposés aux facteurs présents dans le cytoplasme de l'œuf, ces gènes se comportent comme les gènes d'un noyau de zygote. De ce point de vue au moins, la plupart des noyaux de l'embryon et de l'adulte sont équivalents, et leur activité est entièrement déterminée par les facteurs présents dans la cellule.

Qu'en est-il pour d'autres organismes que le xénope ? Les mêmes propriétés ont été démontrées chez les ascidies. Chez les plantes, une cellule somatique isolée peut donner naissance à un plant adulte fertile, ce qui prouve la réversibilité complète de l'état différencié au niveau cellulaire (voir Fig. 7.9). La célèbre brebis Dolly a été le premier mammifère cloné par transfert de noyau de cellule somatique. Dans son cas, le noyau somatique était issu d'une lignée cellulaire dérivée de la glande mammaire. De façon semblable le clonage de souris a été réalisé en utilisant, par exemple, des noyaux de cellules de la corona radiata qui entoure l'ovocyte juste après l'ovulation (voir Chapitre 10), et plusieurs générations de ces souris ont été obtenues en répétant cette méthode.

En général, le taux de réussite du clonage par transfert de noyau somatique est extrêmement faible chez les mammifères, sans qu'on en comprenne bien les raisons. La plupart des mammifères ainsi clonés meurent avant la naissance et ceux qui survivent présentent fréquemment des anomalies. La cause la plus probable de ces échecs est une reprogrammation incomplète du noyau transféré, en particulier en ce qui concerne les modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones) impliquées dans la détermination et l'entretien de l'état différencié (voir Section 8.2). Dans ce cas, l'ADN ne retrouve pas un état proche de celui d'un ovocyte récemment fécondé.

De même, le fait que les gènes reprogrammés n'aient pas subi le processus **d'empreinte génomique** normal, pendant lequel des gènes sont rendus silencieux chez le parent mâle ou femelle (voir Section 10.8) peut expliquer certaines observations. Les adultes issus d'embryons clonés présentent des anomalies comme une mort précoce, des malformations des jambes et de l'hypertension chez les bovins, ou des troubles du système immunitaire chez la souris. Ces défauts sont attribués à des altérations de l'expression génique liées au processus de clonage. La brebis Dolly a développé une arthrite à l'âge de 5 ans et, au vu de son état, a été euthanasiée à 6 ans (un âge relativement jeune) après avoir développé une maladie pulmonaire progressive dont, toutefois, le lien avec le fait qu'elle soit clonée n'est pas établi. Des études ont montré que, chez une souris clonée, 5 % des gènes ne sont pas exprimés de façon correcte et environ la moitié des gènes soumis à empreinte exprimée de façon incorrecte.

Plus récemment, des blastocystes clonés ont été obtenus après transfert de noyau somatique adulte chez les primates et chez l'espèce humaine, en modifiant les protocoles utilisés chez les autres animaux. Dans les deux cas, des noyaux de cellules de peau adulte ont été transférés dans des ovocytes énucléés. La segmentation a souvent été observée, mais seul un petit nombre d'embryons ont formé un blastocyste. La production d'un clone de primate adulte par transfert nucléaire n'a pas encore été réalisée et le clonage d'un être humain par ce moyen, même s'il pouvait l'être, est interdit dans la plupart des pays pour des raisons pratiques et éthiques. Bien que certains médias l'aient suggéré, aucun clonage humain n'est avéré.

L'une des raisons qui pousse à la production de blastocystes clonés de souris ou d'autres mammifères est que ce processus permet de générer, à partir des cellules de la masse cellulaire interne, des cellules ES ayant un fond génétique connu pour étudier, par exemple, des maladies (voir Section 8.18). Des cellules ES de singe et, très récemment, de l'espèce humaine ont ainsi été isolées à partir de blastocystes produits par transfert de noyau somatique.



Fig. 8.30 Clonage par transfert nucléaire. Des noyaux de la même blastula sont transférés dans des ovocytes non fécondés et énucléés de xénope. Les individus qui se développent sont des clones : ils ont la même constitution génétique.



Fig. 8.31 La fusion cellulaire démontre la réversibilité de l'inactivation des gènes au cours de la différenciation. Une cellule hépatique humaine est fusionnée avec une cellule musculaire de souris. Le cytoplasme musculaire de souris provoque l'activation de gènes muscle-spécifiques et la répression de gènes hépato-spécifiques dans le noyau humain (en rouge), et des protéines musculaires humaines et de souris sont produites. Ceci prouve que l'inactivation des gènes muscle-spécifiques dans le foie humain n'est pas irréversible.

8.16 Le profil d'activité génique des cellules différenciées peut être modifié par fusion cellulaire

La transplantation nucléaire dans des œufs, en particulier d'amphibien, est facilitée par leur taille et par l'abondance de leur cytoplasme. Dans d'autres types cellulaires, notamment des cellules différenciées, l'injection d'un noyau étranger n'est pas possible. Par contre, il est relativement simple de mettre en contact le noyau d'une cellule avec le cytoplasme d'une autre en fusionnant les deux cellules, par un traitement chimique ou en utilisant des virus. Après fusion des membranes plasmiques, les deux noyaux partagent un cytoplasme commun. Un inhibiteur de division cellulaire est alors employé pour maintenir les deux noyaux séparés.

La fusion d'érythrocytes de poulet avec des cellules cancéreuses humaines en culture donne un exemple de réversibilité de l'activité génique après fusion cellulaire. Contrairement aux hématies des mammifères, les érythrocytes de poulet matures ont un noyau. Cependant, l'activité génique de ce noyau est nulle et il ne produit aucun ARNm. Lorsqu'un érythrocyte de poulet est fusionné avec une cellule d'une lignée cancéreuse humaine, l'expression génique est réactivée dans le noyau d'érythrocyte et des protéines de poulet sont produites. Cette expression montre non seulement que les gènes de poulet peuvent être réactivés, mais aussi que les cellules humaines contiennent les facteurs cytoplasmiques nécessaires, ce qui constitue un autre exemple de la conservation des gènes de développement essentiels chez les vertébrés.

La fusion de cellules différenciées avec des cellules de muscle strié d'une espèce différente fournit un autre exemple de la réversibilité de l'expression génique dans les cellules différenciées. (Fig. 8.31). Les cellules musculaires striées squelettiques, multinucléées, sont un bon modèle pour l'étude des fusions cellulaires car elles sont grandes et les protéines musculaires sont facilement identifiables. Des cellules différenciées humaines représentatives de chacun des trois feuillets embryonnaires ont été fusionnées avec des cellules musculaires multinucléées de souris. L'immersion des noyaux humains dans le cytoplasme de souris a déclenché chez ces derniers l'expression de gènes muscles-spécifiques. Par exemple, des noyaux d'hépatocytes humains mis dans ces conditions n'expriment plus les gènes spécifiques du foie, mais par contre ses gènes spécifiques des muscles sont activés et des protéines musculaires humaines sont produites. En outre, l'expression de gènes tel myoD, qui peut induire la différenciation musculaire, est aussi activée, ce qui suggère que la reprogrammation des noyaux d'hépatocytes humains dans le cytoplasme musculaire de souris passerait par les mêmes étapes qu'une différenciation musculaire normale.

Ces résultats montrent clairement que le profil d'expression génique des cellules différenciées peut être modifié et que l'expression des gènes peut être contrôlée par des facteurs présents dans le cytoplasme. Comme cela sera vu ci-dessous, certains de ces facteurs sont des facteurs de transcription, et il est donc possible de conclure que l'état différencié est, au moins en partie, entretenu par l'action continue de ces facteurs sur leurs gènes cibles (voir Section 8.3).

8.17 L'état différencié d'une cellule peut changer par transdifférenciation

Une cellule totalement différenciée est généralement stable, ce qui est essentiel à la réalisation d'une fonction particulière dans l'animal mature. Si elle est toujours capable de se diviser, la cellule transmet son état différencié à tous ses descendants. Dans des cellules à grande longévité, comme des neurones, qui ne se divisent plus après différenciation, l'état différencié doit être maintenu stable pendant des années. Les cellules végétales entretiennent leur état différencié tant qu'elles sont dans la plante, mais le perdent si elles sont mises en culture cellulaire (voir Chapitre 7). Sous certaines conditions, les cellules animales différenciées ne sont pas stables, ce qui fournit encore une démonstration de la réversibilité potentielle d'un profil d'activité génique. Le passage d'une cellule différenciée à un autre type de différenciation est appelé transdifférenciation. Le changement de détermination d'un progéniteur engagé dans une voie de différenciation, mais pas encore différencié, vers une autre



lignée cellulaire est appelé **transdétermination**. Les événements rares conduisant à des transformations homéotiques d'une structure adulte en une autre dans les disques imaginaux en régénération de drosophile sont les exemples les mieux connus de transdétermination.

La transdifférenciation est très rare dans le développement normal. Chez les vertébrés, elle est observée au cours de phénomènes de régénération (voir Chapitre 13) et dans certaines pathologies. Cependant, quelques exemples de transdifférenciation sont connus dans le développement normal de non-vertébrés. C'est le cas chez *Caenorhabitis elegans*, où le devenir de chaque cellule peut être suivi, et où un nombre réduit de cellules subit une transdifférenciation. Une cellule épithéliale dite cellule Y, qui participe à la formation du rectum, est mise en place dans l'embryon et présente tous les marqueurs morphologiques et moléculaires d'une cellule épithéliale différenciée. Au second stade larvaire, cette cellule quitte l'épithélium rectal, migre et se transforme en **motoneurone** (nommé PDA), qui forme un axone et met en place des connexions synaptiques. Ici, une cellule épithéliale totalement différenciée et sans aucune caractéristique neuronale subit une transdifférenciation en neurone et perd dans ce processus tous ses caractères épithéliaux. Il reste encore à établir si les deux événements (dédifférenciation de la cellule Y, redifférenciation en PDA) sont successifs ou simultanés.

Un exemple particulièrement intéressant de transdifférenciation concernant le muscle strié de méduse suggère un rôle de la matrice extracellulaire dans le contrôle de l'état différencié. Lorsqu'un morceau de muscle strié est mis en culture avec la matrice extracellulaire qui lui est associée (mésoglée), l'état du muscle strié est maintenu. Mais si le tissu mis en culture est traité par des enzymes dégradant la matrice extracellulaire, les cellules forment un agrégat et, en 1-2 jours, certaines se transdifférencient en cellules musculaires lisses, qui ont une morphologie différente, puis apparaît un second type cellulaire sous la forme de cellules nerveuses. Cet exemple suggère un rôle de la matrice extracellulaire dans le maintien de l'état différencié du muscle strié.

Un exemple classique de transdifférenciation chez les vertébrés est fourni par la régénération du cristallin de l'œil de triton (Fig. 8.32). Lorsque le cristallin est complètement enlevé par chirurgie, un nouveau cristallin commence à se former 10 jours environ après l'opération à partir de la région dorsale de l'épithélium pigmenté de l'iris. Tout d'abord, les cellules de l'iris se dédifférencient (elles perdent

Fig. 8.32 Régénération du cristallin chez le triton adulte. En haut : après ablation du cristallin, un nouveau cristallin est régénéré à partir de la région dorsale de l'épithélium pigmenté de l'iris. En bas : coupes d'yeux de triton, intact et en régénération, observées en microscopie électronique à balayage. (a) Œil intact. La chambre antérieure contenant l'humeur aqueuse (aq) est limpide ; la chambre postérieure contenant l'humeur vitrée (v) est remplie de matrice extracellulaire qui apparaît sous forme de couches compactes (en rose). Le cristallin est en gris, la cornée en bleu clair, la rétine en violet, les ligaments et la matrice associés à l'attache du cristallin en marron. (b) 5 jours après ablation du cristallin. La chambre antérieure est envahie par la matrice extracellulaire et l'iris est épaissi. (c) 25 jours après ablation du cristallin. La chambre antérieure redevient progressivement limpide ; à ce stade, le nouveau cristallin, qui s'est mis en place à partir du bord dorsal de l'iris, est maintenant attaché ventralement à celui-ci (flèche). La matrice extracellulaire dans la chambre postérieure se réorganise. Grossissement x 50.

Photographies de Tsonis, P.A., et al. 2004, reproduites avec l'autorisation de Int. J. Dev. Biol. 2004, **48**: 975-980. leur pigmentation ; leur forme change et l'épithélium pavimenteux devient cylindrique) et commencent à proliférer. Elles se redifférencient ensuite pour former un nouveau cristallin. Fait remarquable, ces capacités de l'iris (transdifférenciation et régénération d'un cristallin) ne diminuent pas avec l'âge. Un projet au long cours a réalisé 18 ablations successives sur le même triton, qui avait plus de 30 ans lors de la dernière opération.

Chez les mammifères ou les oiseaux adultes, le cristallin ne régénère pas *in vivo*. En culture, il est possible d'induire une transdifférenciation de cellules de la rétine pigmentaire d'embryon de poulet. Une cellule isolée de cet épithélium peut produire en culture une monocouche de cellules pigmentaires. Si la culture est mise en présence d'hyaluronidase, de sérum et de phénylthiourée, les cellules perdent leurs pigments et leurs caractéristiques de cellule de la rétine. Si elles sont alors cultivées à haute densité en présence d'acide ascorbique, les cellules commencent à présenter des caractéristiques de cellules cristalliniennes (elles produisent la cristalline, une protéine spécifique du cristallin). Il faut souligner que, dans le cas du triton comme dans le cas du poulet, la transdifférenciation se fait entre des types cellulaires qui ne sont pas sans relations : les cellules pigmentées de la rétine ou de l'iris dérivent, comme les cellules du cristallin, de l'ectoderme (le développement de l'œil de vertébré est évoqué dans le Chapitre 11)

La transdifférenciation pourrait aussi expliquer certains cas bien connus dans l'espèce humaine où, en général à l'occasion de réparation tissulaire, quelques rares cellules différenciées d'un autre type apparaissent de façon ectopique dans un tissu, par exemple des cellules hépatiques dans le pancréas ou *vice versa*, un épithélium de type gastrique dans l'œsophage au lieu de l'épithélium pavimenteux stratifié. Dans ce dernier exemple, connu sous le nom de syndrome de Barett, la modification est associée à une prédisposition du patient pour le développement de cancer de l'œsophage, ce qui souligne l'importance clinique de la transdifférenciation. D'un autre côté, plus optimiste, la maîtrise du processus de transdifférenciation permettrait de produire des types cellulaires différenciés d'intérêt pour la médecine régénérative (voir Section 8.18).



Fig. 8.33 Stratégies en médecine

régénérative. Un tissu lésé, malade ou déficient pourrait être réparé par des thérapies cellulaires où des cellules souches (ES, iPS ou cellules souches adultes) pourraient être utilisées pour produire des cellules nécessaires à une transplantation de cellules seules ou de cellules sur un support (flèches bleues). Une autre stratégie consiste à développer des médicaments actifs sur les tissus voisins non endommagés (flèche rouge), pour stimuler les cellules souches adultes endogènes et/ou induire une transdifférenciation, afin de générer des cellules capables de remplacer le tissu altéré (flèche verte).

8.18 Les cellules souches pourraient être une clé de la médecine régénérative

Le but de la médecine régénérative est de restaurer la structure et la fonction des tissus endommagés ou malades. Parmi les stratégies adoptées, les **thérapies cellulaires** consistent à restaurer le tissu par l'introduction de nouvelles cellules saines. Les cellules souches, qui peuvent proliférer et se différencier en de multiples types cellulaires, représentent une formidable source cellulaire pour ces thérapies. Cela peut passer par la transplantation de cellules de remplacement, soit seules, soit ensemencées sur un support tridimensionnel, fait en général de matériaux inertes (Encart 8C). Une autre stratégie consiste à stimuler, par des drogues, les cellules souches endogènes et/ou à induire une transdifférenciation dans des tissus sains voisins pour générer les cellules de remplacement (Fig. 8.33). Ces thérapies pourraient représenter une alternative à la transplantation d'organes depuis un donneur avec ses problèmes associés, à savoir risques de rejet, manque de donneurs. Elles sont aussi un espoir pour la réparation d'organes comme le cerveau ou les nerfs.

L'utilisation de cellules ES et de cellules souches adultes a été envisagée dans un but thérapeutique. Quelques traitements de thérapie cellulaire sont déjà été testés chez des patients pour leur efficacité et leur innocuité. Des essais cliniques d'une thérapie cellulaire pour certains types de dégénérescence maculaire, maladie dégénérative de l'œil conduisant éventuellement à la cécité, ont été récemment tentés. Le principal objectif était de tester l'innocuité de la procédure. Des cellules pigmentaires de rétine dérivées de cellules ES humaines ont été injectées dans l'œil des patients. La transplantation des cellules n'a causé aucun effet nocif et une légère amélioration de la vue a même été détectée.

ENCART 8C Ingénierie tissulaire et cellules souches



La médecine régénérative est la branche médicale dont l'objet est de réparer ou de remplacer les cellules et tissus endommagés pour restaurer une fonction normale (voir Fig. 8.33). Les perspectives actuelles et futures de la thérapie cellulaire, qui utilise des cellules saines dérivées des différents types de cellules souches, sont discutées dans les Sections 8.17 et 8.18. Les cellules souches sont également employées en **ingénierie tissulaire** pour construire des tissus ou organes de remplacement à des fins de transplantation.

Un exemple, encore très expérimental, de cette utilisation est la transplantation de trachée construite par ingénierie tissulaire pour remplacer une trachée malade. Bien que le succès (c'est-à-dire la restauration d'une fonction trachéenne normale sur le long terme) soit toujours incertain, ces études ont montré par la pratique que l'ingénierie tissulaire nécessite des équipes très pluridisciplinaires. La première opération de ce type a consisté à remplacer une trachée sévèrement endommagée par la tuberculose. La trachée d'un donneur récemment décédé a fourni le support inerte, toutes les cellules du donneur ayant été éliminées pour ne conserver que la matrice extracellulaire). Plus récemment, un patient avec une tumeur inopérable de la trachée a été traité de façon similaire en exploitant un support

observée en imagerie par résonnance magnétique. Dans les deux cas, le support a été ensemencé à l'intérieur avec des cellules épithéliales de la paroi trachéenne du patient à traiter, et à l'extérieur avec des chondrocytes différenciés en culture à partir de cellules souches mésenchymateuses dérivées de sa moelle osseuse. Les supports ensemencés ont été placés dans un bioréacteur (un incubateur de culture particulier) pour promouvoir la prolifération cellulaire et la différenciation. Dans le premier cas, la trachée de remplacement était prête pour l'implantation chirurgicale après 4 jours d'incubation en bioréacteur (Figure 1). Dans le deuxième cas, le protocole a été affiné et des molécules de signalisation ont été ajoutées dans le bioréacteur ; ce traitement a également été continué après la transplantation de la trachée artificielle, dans le but de stimuler la régénération et la réparation à partir des cellules souches endogènes du patient.

Dans les deux cas, la fonction de la trachée semble avoir été restaurée, bien que la façon exacte dont la paroi trachéenne s'est reconstituée ne soit pas claire. Un suivi à 5 ans après la transplantation de la trachée reconstituée à partir d'un support biologique suggère que la procédure est efficace, mais qu'il y a encore de nombreuses questions en attente de réponse avant d'en faire une routine. Il faut aussi rappeler que la trachée a une structure très simple et qu'il sera beaucoup plus ardu de reconstruire des organes plus complexes.

La **transdifférenciation induite** apparaît comme une alternative pour générer des types cellulaires choisis, mais l'obtention, directement à partir de cellules adultes différenciées, de **cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS** pour *induced Pluripotent Stem cells*) semble la voie la plus prometteuse. Ces cellules, en principe, évitent certains des inconvénients causés par les cellules ES et les cellules souches adultes (Encart 8D).

ENCART 8D Les cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS)

Les cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS pour induced Pluripotent Stem cells), sont sans doute l'exemple le plus spectaculaire de reprogrammation d'une cellule différenciée adulte. Ces cellules, qui ressemblent aux cellules ES, sont obtenues en introduisant dans une cellule différenciée les gènes de quatre facteurs de transcription associés à la pluripotentialité. Il avait été démontré auparavant que la fusion avec des cellules ES transformait des cellules somatiques adultes en cellules pluripotentes, suggérant que des facteurs cytoplasmiques présents dans la cellule ES pouvaient être responsables. Néanmoins, le fait qu'aussi peu de facteurs soient nécessaires à l'induction de la pluripotentialité a été une surprise.

Les cellules iPS ont d'abord été obtenues chez la souris en 2006, à partir de fibroblastes de peau provenant de souris transgéniques portant un marqueur de sélection (résistance à un composé chimique) lié à l'expression d'un des gènes associés à la pluripotentialité (Oct4 ou Nanog). Les gènes de guatre facteurs de transcription associés à la pluripotentialité dans les cellules ES (Oct4, Sox2, Kfl4, et c-Myc) ont été introduits dans ces fibroblastes adultes en utilisant des vecteurs rétroviraux (Figure 1). L'utilisation du composé chimique approprié a permis de sélectionner les rares cellules iPS en éliminant la plupart des cellules transfectées qui n'exprimaient pas Oct4 ou Nanog. Les colonies de cellules restantes ressemblant aux cellules ES ont pu être isolées et multipliées en culture. Les gènes insérés dans les cellules iPS se sont éteints d'eux-mêmes une fois le processus de reprogrammation achevé et les cellules ont réactivé leurs propres gènes de pluripotentialité, entretenant donc leur état pluripotent. Bien que Nanog ne fasse pas partie du cocktail iPS, son expression lors des derniers stades de reprogrammation est essentielle pour obtenir de vraies cellules iPS. Seules les cellules exprimant Nanog sont réellement pluripotentes, c'est-à-dire capables d'auto-renouvellement, de se différencier en culture et, surtout, de contribuer à des chimères fertiles (voir Encart 8B). Peu de temps après, le même ensemble de gènes de facteurs de transcription était testé avec succès pour reprogrammer des fibroblastes humains adultes. Toutefois, les conditions de prolifération des cellules iPS humaines sont différentes, les cellules de souris ayant besoin de LIF, et les humaines de FGF. Des cellules iPS humaines ont aussi été obtenues par d'autres groupes en utilisant un cocktail légèrement différent de facteurs de transcription.

La pluripotence des cellules iPS de souris a été testée en les injectant dans des blastocystes de souris normales, qui sont ensuite réimplantés dans une souris porteuse. Tous les types cellulaires des embryons issus de ces blastocystes contiennent des descendants des cellules iPS, y compris la lignée germinale. Les gamètes dérivés des cellules iPS participent à la fécondation lors de croisements souris normales/souris chimériques iPS, donnant des descendants viables. Plus récemment, des souris adultes fertiles entièrement issues de cellules iPS ont été obtenues à partir de blastocystes tétraploïdes dans lesquels des cellules iPS dérivées de fibroblastes avaient été injectées.

Les recherches de ces dernières années explorent les moyens d'induire une pluripotence sans utiliser de vecteur viral qui persiste dans le génome, ce qui est un pré-requis pour toute utilisation médicale des cellules iPS en thérapie cellulaire (voir Section 8.18). Des vecteurs exploitant des transposons, capables après l'acquisition de la pluripotentialité, d'autoexciser leur séquence et celle des gènes qu'ils transportent, ont été produits. D'autres approches tentent de trouver des petites molécules médicamenteuses qui agiraient en co-activateurs des gènes de pluripotentialité de la cellule elle-même.

Réduire le nombre de gènes à transfecter est aussi une voie de recherche active. Des cellules souches neurales adultes ont été reprogrammées par la transfection d'un seul facteur de transcription, Oct4. Cependant, ces cellules expriment déjà à un haut niveau leurs propres gènes *Sox2* et *c-Myc*, ce qui pourrait expliquer pourquoi la transfection de *Oct4* seul est suffisante pour induire la pluripotence.

Les cellules ES ont l'avantage sur les cellules souches adultes de pouvoir se différencier en tout type de cellule et donc, au moins en théorie, d'être en mesure de réparer n'importe quel tissu. Mais les cellules souches d'un embryon donneur non apparenté risquent de provoquer des réactions de rejet immunitaire. De plus, compte tenu des capacités prolifératives et de la pluripotence des cellules ES, le risque de développement de tumeurs dérivées de ces cellules est élevé. Des cellules ES injectées après culture dans un embryon se développent normalement mais lorsque ces cellules ES de souris sont injectées sous la peau d'une souris de même identité génétique, elles provoquent l'apparition d'un tératocarcinome (Fig. 8.34). Ces tumeurs atypiques contiennent un mélange de cellules différenciées.

Le **clonage thérapeutique** par transfert de noyau somatique présente un avantage certain pour générer des cellules ES à partir de tissus d'un patient (voir Section 8.15). Un noyau d'une cellule somatique du patient est introduit dans un ovocyte énucléé, qui est ensuite cultivé jusqu'au stade blastocyste. Ce blastocyste peut alors

Méthode d'introduction ou d'activation de gènes de pluripotence	Intégration dans le génome	Avantages	Désavantages
Vecteurs viraux			
Vecteur de type rétroviral. Méthode originelle de Takahashi et Yamanaka (2006). Plusieurs virus portant chacun un gène de facteur de transcription	Oui. Les transgènes deviennent généralement silencieux dans les cellules iPS après reprogrammation et intégration	Reprogrammation efficace et stable	Les vecteurs et les transgènes restent dans le génome et pourraient être réactivés dans des cellules différenciées
Vecteur de type lentivirus ; un vecteur code souvent plusieurs facteurs de transcription	Oui. Les transgènes sont susceptibles de rester actifs après reprogrammation et intégration, mais peuvent être excisés en utilisant un système Cre/lox (voir Encart 3D) ou rendus silencieux en les mettant sous contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline et en éliminant la drogue		Les longues répétitions terminales du vecteur restent dans le génome et pourraient activer des oncogènes s'îls sont intégrés à proximité d'eux
Les vecteurs rétroviraux et lentiviraux sont couram dans le génome, ils ne peuvent pas être utilisés po	ment employés pour produire des cellules iPS à des fins de recherche m ur générer des cellules iPS utilisables en recherche clinique	ais, en raison de la persistance	e du vecteur et des transgènes
Plasmides d'ADN et transposons			
Transposon <i>piggybac</i> modifié + plasmide portant la transposase PB	Le vecteur s'intègre mais est excisé par la transposase	Reprogrammation efficace. Cellules différenciées libres de transgène et de vecteur	Certaines cellules peuvent encore conserver des petits morceaux de l'ADN intégré
Plasmide linéaire portant des sites <i>loxP</i>	Le vecteur s'intègre mais est excisé en présence de la recombinase Cre	Cellules différenciées libres de transgène et de vecteur	Moins efficace que les vecteurs viraux
Plasmides ne s'intégrant pas	Non. Les plasmides sont dilués avec les divisions des cellules iPS		
Méthodes n'utilisant pas d'ADN			
Transfection avec des ARN synthétiques (cellules RiPS pour <i>RNA-induced iPS cells</i>)	Cellules différenciées libres de tout ADN exogène		Nécessité de transfections répétées
Facteurs de transcription protéiques]		Long et moins efficace que les vecteurs viraux
Activation des gènes de pluripotentialité endogènes par traitement chimique (cellules CiPS pour <i>Chemically induced iPS cells</i>)			Méthode relativement nouvelle Une reprogrammation complète a été obtenue en 2012 Méthode lengue

Figure 1

être utilisé comme source de cellules ES, cultivables *in vitro* et qui, lors d'une greffe chez le patient, ne provoquent pas de rejet immunitaire. Actuellement, des cellules ES humaines ont été produites par cette méthode mais le taux de succès est extrêmement faible.

Des objections éthiques ont été présentées contre l'utilisation des cellules ES et du clonage thérapeutique. Obtenir des cellules ES implique de détruire un blastocyste et certains pensent que ce processus détruit une vie humaine. Le fait qu'un blastocyste puisse donner des jumeaux jusqu'à un stade avancé tend à prouver qu'un blastocyste ne peut pas être considéré comme un individu à ce stade très précoce. Par ailleurs, de nombreux embryons précoces sont perdus lors de la procréation assistée utilisant une fécondation *in vitro* (FIV), une pratique médicale pourtant largement acceptée ce qui semble en contradiction avec un rejet de l'utilisation des cellules ES. De nouvelles approches alternatives, comme la transdifférenciation ou l'utilisation de cellules iPS, pourraient permettre d'éviter ces obstacles éthiques associés au clonage thérapeutique.



Fig. 8.34 Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) donnent des tissus normaux ou des tumeurs en fonction des signaux reçus de leur environnement. Des cellules ES dérivées de la masse cellulaire interne d'un blastocyste de souris et maintenues en culture contribuent à la formation d'une souris chimérique normale si elles sont injectées dans un embryon précoce (à gauche), mais provoquent l'apparition d'un tératocarcinome si elles sont injectées sous la peau d'une souris adulte (à droite).

> L'utilisation des cellules souches adultes a aussi été envisagée en thérapie cellulaire. La greffe de cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse de donneurs, est utilisée avec succès depuis de nombreuses années pour traiter certaines maladies immunitaires ou certains cancers, malgré les problèmes associés comme des réactions de rejet. Ces problèmes n'existent pas si les cellules souches adultes greffées ont été isolées à partir des tissus du patient. Ce type d'approche est déjà utilisé dans le cas de greffes de peau qui utilisent la propre peau du patient. Mais la gamme de tissus pouvant être réparés chez un patient en utilisant ses propres cellules souches est limitée. Isoler des cellules souches adultes du cerveau, par exemple, n'est pas possible. Quelques cas de différenciation de cellules souches hématopoïétiques en des types cellulaires notablement différents des lignées hématopoïétiques classiques ont été signalés. Mais il a été démontré que ces cellules souches ne sont pas capables de donner des types cellulaires hors de leur répertoire normal. Les observations précédentes s'expliqueraient par une fusion entre les cellules souches hématopoïétiques et des cellules du receveur.

8.19 Des approches variées permettent d'obtenir des cellules différenciées utilisables en thérapie cellulaire

L'un des principaux défis de la thérapie cellulaire substitutive concerne la mise au point de protocoles de différenciation permettant d'obtenir les types cellulaires particuliers nécessaires à la réparation, qu'ils soient obtenus à partir de cellules ES ou iPS, de cellules souches adultes ou par transdifférenciation. Actuellement, l'une des cibles médicales majeures est la production de cellules pancréatiques secrétant de l'insuline (cellules β) utilisables dans le traitement du diabète de type 1 et cet exemple sera utilisé pour illustrer les approches expérimentales développées en thérapie cellulaire.

Dans le diabète de type 1, les cellules β du pancréas endocrine (les îlots de Langerhans) sont détruites par une réaction auto-immune. La production d'insuline est remise en cause et la teneur en sucre du sang peut atteindre un taux potentiellement létal. À la différence du muscle ou du sang, le pancréas ne contient pas de cellules souches dédiées, qui pourraient lui permettre de régénérer. Toute leur vie, les diabétiques de type 1 sont donc dépendants d'injections d'insuline. Il est possible de transplanter un pancréas ou des îlots issus de donneurs décédés, mais les donneurs sont rares et l'opération s'accompagne d'un traitement immunosuppresseur lourd pour éviter le rejet. La greffe de cellules β dérivées de cellules du patient, accompagnée de l'induction d'une tolérance immunitaire de ces cellules, pourrait fournir une solution à long terme pour ces patients.

La différenciation de cellules ES en types cellulaires dérivés de l'endoderme, comme les cellules pancréatiques, est particulièrement délicate à maîtriser. De plus, pour être utilisables en thérapie cellulaire, les cellules produites doivent aussi être capables de répondre aux signaux qui déclenchent la production d'insuline, comme le glucose. Le contrôle de la différenciation de l'endoderme et du pancréas au cours du développement a servi de base au développement de méthodes permettant d'obtenir la différenciation de cellules ES en progéniteurs pancréatiques. À partir de cellules ES humaines, un protocole expérimental de 9 jours, passant par des traitements successifs avec différentes molécules de signalisation, permet d'obtenir des cellules produisant le facteur de transcription FoxA2, un marqueur spécifique endodermique, mais seulement quelques cellules (environ 5 %) produisent dans ces cultures Pdx1, un facteur de transcription essentiel au développement du pancréas. Une librairie de 5 000 composés organiques a alors été testée et l'un d'entre eux, l'indolactame V, s'est révélé être un stimulateur de la différenciation de cellules Pdx1-positives. Le traitement conjoint d'une culture de cellules ES par l'indolactame V et le FGF10 (l'un des signaux impliqués au cours du développement pancréatique embryonnaire) permet d'obtenir 45 % de cellules Psx1-positives. Chez la souris, ces cellules exprimant Pdx1 se différencient en cellules sécrétrices d'insuline si elles sont greffées sous la capsule rénale, un site qui permet une différenciation continue (Fig. 8.35).

Les cellules iPS représentent sans doute la voie la plus prometteuse pour obtenir des cellules pluripotentes utilisables en thérapie cellulaire à partir des cellules d'un patient. Comme le décrit l'Encart 8D, les cellules iPS ont tout d'abord été obtenues à partir de fibroblastes de souris en introduisant et en faisant exprimer dans ces cellules les gènes de quatre facteurs de transcription associés à la pluripotentialité des cellules ES : Oct 3/4, Sox2, c-Myc et Klf4. En ce qui concerne le diabète, des cellules iPS ont été obtenues à partir de fibroblastes de patients atteints de diabète de type 1 reprogrammés en utilisant les gènes *OCT4*, *SOX2* et *KLF4*. Des cellules productrices d'insuline ont été ensuite obtenues (Fig. 8.35). Ces cellules seront d'abord utilisées pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du diabète de type 1, qui sont encore largement inconnus.

L'induction d'une transdifférenciation permet également d'obtenir des cellules d'un type donné, bien que cette méthode soit probablement limitée à des types cellulaires proches de la cellule initiale. Dans le cas du diabète, la faisabilité de cette approche a été prouvée : il est possible d'obtenir des cellules sécrétrices d'insuline à partir de cellules hépatiques ou de cellules du pancréas exocrine. Dans l'embryon, le foie et le pancréas dérivent de régions adjacentes de l'endoderme. Le facteur de transcription Pdx1, essentiel pour la différenciation pancréatique, n'est pas produit par les cellules hépatiques. La production transitoire d'une forme activée de Pdx1, sous contrôle d'un promoteur spécifiquement hépatique, dans le foie d'un xénope transgénique, convertit l'essentiel du foie en tissu pancréatique exocrine et endocrine, avec disparition de protéines hépatiques caractéristiques dans les régions concernées. Dans un autre exemple de transdifférenciation, les progéniteurs hépatiques du foie de souris adulte ont été reprogrammés en cellules sécrétrices d'insuline ressemblant aux cellules β après injection dans le foie de vecteurs viraux contenant le gène de la neurogénine 3, un autre facteur de transcription pancréatique.

Fig. 8.35 Trois stratégies expérimentales pour obtenir des cellules productrices d'insuline par reprogrammation nucléaire.

Deux stratégies partent d'un fibroblaste de peau. Dans le cas du transfert de noyau somatique, le noyau du fibroblaste est injecté dans un ovocyte non fécondé et des cellules ES sont isolées à partir du blastocyste obtenu. L'autre démarche consiste à obtenir des cellules pluripotentes induites (cellules iPS) en transfectant les fibroblastes avec les gènes des facteurs de transcription de pluripotentialité (Oct4, Sox2, Kfl4). Les cellules ES ou iPS peuvent ensuite être traitées in vitro pour obtenir la différenciation voulue, ici en cellules productrices d'insuline. Une troisième stratégie possible vise la transdifférenciation in vivo de cellules pancréatiques exocrines ou d'hépatocytes adultes en cellules productrices d'insuline par la transfection ciblée dans ces organes de gènes (en particulier celui du facteur de transcription Pdx1) requis pour la différenciation des cellules du pancréas endocrine. Les étapes en rouge ont été réalisées avec des cellules humaines bien que le taux d'obtention de cellules ES à partir de blastocystes humains développés suite à un transfert de noyau somatique soit extrêmement faible. Ceci signifie que cette stratégie pour produire des cellules humaines productrices d'insuline n'est pas exploitable actuellement. Des cellules de ce type répondant au glucose ont été obtenues à partir de cellules ES humaines dérivées d'un blastocyste normal et différenciées in vitro.

D'après Gurdon J. B., Melton, D. A. : **Nuclear reprogramming in cells.** Science 2008, **322** : 1811-1815.



La transdifférenciation de cellules pancréatiques exocrines en cellules β endocrines est également possible. Elle a été observée après introduction des gènes de trois facteurs de transcription nécessaires à la différenciation pancréatique (dont *Pdx1*) dans le pancréas par le biais d'adénovirus génétiquement modifiés. Bien que n'étant pas organisées en îlots, les cellules induites ressemblaient beaucoup aux cellules endocrines normales et étaient capables de sécréter de l'insuline. Cette transdifférenciation semble efficace (environ 20 %) et rapide, les premières cellules insuline-positives apparaissant 3 jours après le traitement.

Il reste cependant de nombreux obstacles à franchir avant que l'utilisation thérapeutique de ces techniques fondées sur les cellules ES et iPS ou sur la transdifférenciation ne soit effective. Les méthodes les plus efficaces pour obtenir des cellules iPS ou pour déclencher une transdifférenciation utilisent des vecteurs viraux pour introduire des gènes de pluripotentialité dans les cellules. Or ces vecteurs s'intègrent aléatoirement dans le génome et peuvent activer des gènes de cancérisation. Des méthodes alternatives d'induction de l'expression des facteurs de transcription nécessaires doivent donc être mises au point avant toute utilisation médicale. Heureusement, il est possible, après que la pluripotentialité a été établie, d'éliminer le vecteur viral ainsi que les gènes introduits tout en conservant un phénotype iPS stable. En effet une fois la pluripotence induite par les gènes introduits, elle est maintenue par l'activation des gènes de la cellule elle-même. Enfin, il a été prouvé que l'introduction directe des protéines de pluripotentialité (plutôt que des gènes) permet la production de cellules iPS à partir de fibroblastes embryonnaires de souris.

Cependant, même si des méthodes non virales d'induction de la pluripotentialité sont mises au point, le risque tumorigène des cellules ES ou iPS ne sera pas éliminé. Si des cellules indifférenciées persistent au cours du processus de différenciation et sont transplantées chez les patients au cours de la thérapie cellulaire, elles risquent de provoquer l'apparition de tumeurs (voir Fig. 8.34). Seule une sélection sévère éliminant toute cellule indifférenciée dans la population à transplanter résoudra ce problème. De plus, la stabilité à long terme des cellules ES ou iPS différenciées n'est pas connue. Enfin, il faut réussir à produire suffisamment de cellules pour un traitement efficace, ce qui est loin d'être acquis.

Une seule application médicale a été ici envisagée, à savoir la production de cellules sécrétrices d'insuline dans le but de traiter le diabète de type 1. Des stratégies analogues peuvent être envisagées pour d'autres maladies, comme la maladie de Parkinson pour laquelle des cellules iPS ont été obtenues à partir de patients atteints. Les cellules iPS seront dans l'avenir un outil de choix pour explorer les processus cellulaires concernés dans des cellules humaines, ce qui permet de dépasser les limites des modèles animaux qui ne reproduisent pas toujours exactement les caractéristiques des maladies humaines. Par exemple, la production in vitro de neurones dérivés de cellules iPS obtenues à partir de fibroblastes de peau d'un enfant présentant une amyotrophie spinale héréditaire s'est révélée très différente de la production observée à partir de cellules iPS de sa mère présentant un phénotype normal : le nombre et la taille des neurones décroissaient au cours du temps. De telles cultures sont utilisables pour tester l'effet de médicaments, et donc le développement de traitements cliniques. Plus généralement, les cellules iPS sont des outils potentiels pour les études de cytotoxicité ou de tératogénicité communes dans le développement des médicaments.

RÉSUMÉ

La transplantation de noyaux de cellules animales différenciées dans des ovocytes fécondés et des études de fusion cellulaire montrent que le profil d'expression génique du noyau d'une cellule différenciée peut souvent être inversé, ce qui prouve que ce profil dépend de facteurs présents dans le cytoplasme et que la cellule ne perd aucun matériel génétique au cours de la différenciation. Bien que l'état différencié d'une cellule animale soit habituellement très stable in vivo, il existe des exemples de différenciation réversible. La transdifférenciation d'un type cellulaire en un autre est observée dans quelques cas de régénération et en culture de cellules. Les amphibiens et certains mammifères peuvent être clonés par transplantation nucléaire d'un noyau de cellule somatique dans un œuf énucléé. Les cellules souches s'auto-renouvellent et peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires. Elles sont étudiées à des fins de thérapie cellulaire. L'introduction dans des cellules adultes différenciées de quatre facteurs de transcription exprimés dans les cellules souches embryonnaires induit la pluripotentialité de ces cellules. Ces cellules souches pluripotentes induites, comme l'induction de la transdifférenciation, sont des voies alternatives de production de cellules à des fins de thérapie cellulaire.

Résumé du Chapitre 8

- La différenciation cellulaire génère des types cellulaires distincts, comme les cellules sanguines, nerveuses ou musculaires, dont les fonctions spécialisées et les propriétés sont liées à leur profil d'expression génique et donc aux protéines spécialisées qu'elles produisent.
- La première étape de la différenciation est l'engagement, ou détermination, de la cellule vers un type particulier. La suite de la différenciation se passe progressivement, souvent sur plusieurs générations cellulaires.
- Une différenciation est le résultat de l'expression et de l'extinction d'ensembles particuliers de gènes.
- Le profil d'expression génique d'une cellule différenciée peut être entretenu sur de longues périodes de temps et transmis à la descendance de cette cellule. Son maintien

implique différents mécanismes, dont l'action continuelle de protéines régulatrices de gènes ou des modifications épigénétiques de la chromatine (comme la méthylation de l'ADN, l'acétylation et la méthylation des protéines histones).

- L'état différencié d'une cellule animale in vivo est habituellement très stable. Dans certains cas la transdifférenciation d'une cellule différenciée en un autre type cellulaire peut se produire.
- De nombreux tissus adultes, comme le sang, l'épiderme et l'épithélium intestinal sont continuellement remplacés à partir de cellules non différenciées et qui s'auto-renouvellent appelées cellules souches. D'autres tissus, comme le muscle squelettique, possèdent des cellules souches résidentes activables en cas de blessure tissulaire.
- Des cellules souches pluripotentes embryonnaires de mammifère peuvent être isolées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste, et mises en culture. Leur différenciation en de nombreux types cellulaires peut être induite en culture. Les cellules souches embryonnaires de souris peuvent générer tous les types cellulaires de l'animal.
- Le clonage des amphibiens et de quelques mammifères par transfert de noyau somatique dans un œuf énucléé montre que le noyau d'une cellule différenciée peut être reprogrammé et ramené à un état dans lequel il est capable d'orchestrer le développement embryonnaire.
- Des cellules souches pluripotentes induites peuvent être obtenues à partir de cellules somatiques différenciées adultes par l'expression de quatre facteurs de transcription associés à la pluripotence des cellules souches embryonnaires.
- Les cellules pluripotentes peuvent proliférer et se différencier dans tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires ; elles pourraient devenir un atout majeur de la médecine régénérative.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Utiliser le glossaire pour revoir les termes « devenir », « spécification » et « détermination ». En quoi ces états cellulaires diffèrent-ils du sujet de ce chapitre, la différenciation ?

2. Comparer les concepts de gènes (et protéines) « de ménage » avec les gènes (et protéines) cellule-spécifiques qui caractérisent et définissent un type de cellule différenciée. Proposer une expérience de type puce à ADN ou séquençage d'ARN qui pourrait distinguer l'expression de gènes tissu-spécifiques et l'expression de gènes de ménage dans des cellules musculaires et des neurones.

3. La fonction d'un gène est souvent étudiée par une expression ectopique de la protéine produite, c'est-à-dire dans un site anormal chez l'embryon ou dans un tissu inhabituel chez l'adulte, afin de voir les effets de cette protéine. Quelles propriétés essentielles de l'appareil transcriptionnel rendent cette expression ectopique expérimentalement possible (inclure les rôles des séquences *cis*-régulatrices et des facteurs de transcription) ?

4. Créer deux listes : molécules protéiques de signalisation, molécules lipidiques de signalisation. En quoi leurs mécanismes d'action sont-ils différents ? Quel(s) mécanisme(s) généraux peut-on dégager concernant l'activation d'un facteur de transcription ?

5. La division cellulaire implique la séparation des deux brins d'ADN au cours de la réplication, ce qui perturbe les profils d'expression génique établis auparavant dans la cellule. Néanmoins, les deux cellules filles doivent d'une façon ou d'une autre se « rappeler » l'état différencié de la cellule mère. Discuter des

mécanismes de transmission de l'état différencié utilisant des facteurs de transcription, la structure de la chromatine et la méthylation de l'ADN.

6. L'hématopoïèse comporte entre autres la différenciation des lymphocytes (B et T), des érythrocytes, des macrophages et des neutrophiles à partir de cellules de la moelle osseuse. Décrire les grandes étapes qui conduisent à chacun de ces types cellulaires, en précisant le nom de la cellule dont ils dérivent tous.

7. Qu'entend-on par « niche des cellules souches » et quel est son rôle ? Choisir l'une des niches décrites dans le texte et donner des exemples de molécules de signalisation impliquées dans ce rôle.

8. La différenciation de la lignée érythroïde nécessite une signalisation par l'érythropoïétine (EPO), un peptide fabriqué par le rein en réponse à un manque d'érythrocytes. L'une des cibles de l'EPO est le facteur de transcription GATA-1, et EPO est lui-même une cible de GATA-1. La β -globine est aussi une cible de GATA-1. À partir de ces données, proposer un schéma de régulation permettant de produire davantage d'érythrocytes en réponse à un besoin physiologique, depuis les cellules souches multipotentes jusqu'aux érythrocytes produisant la globine.

9. Décrire les facteurs de transcription impliqués dans l'orientation de la différenciation vers les neutrophiles ou vers les macrophages. Même question pour les molécules de signalisation impliquées.

10. Quelles sont les propriétés des diverses globines exploitées aux différents stades du développement ? Comment le changement de type de globine est-il vraisemblablement contrôlé ?

11. Décrire le processus permettant le remplacement des cellules épithéliales de l'intestin à partir d'une population de cellules souches. Quel est le rôle de la voie de signalisation Wnt dans ce processus ?

12. Bien que ce gène puisse agir comme un gène maître de la différenciation musculaire, des souris ayant *myoD* invalidé sont viables. En se référant à la Fig. 8.11, proposer une explication. Au contraire, une double invalidation *myoD/myf5* est létale ; de même l'invalidation de *mrf4* est létale. Comment interpréter ces résultats ?

13. La sortie du cycle cellulaire est nécessaire à la différenciation des cellules musculaires. Développer les points suivants à ce propos : (1) le retrait des facteurs de croissance provoque la différenciation des précurseurs musculaires en culture. (2) MyoD active la production de p21. (3) la perte de Rb permet aux myoblastes d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire.

14. Décrire la méthode de clonage par transfert nucléaire. En quoi le fait que celle-ci soit possible illustre-t-il l'importance de l'ensemble des facteurs de transcription présents dans une cellule donnée ? *A contrario*, en quoi les difficultés rencontrées illustrent-elles l'importance des mécanismes épigénétiques au cours du développement ?

15. Les cellules ES et les cellules iPS sont des cellules pluripotentes mais elles ne sont pas obtenues par les mêmes méthodes. Décrire ces méthodes.

16. Quels sont les avantages et désavantages potentiels des cellules iPS par rapport aux cellules ES pour une utilisation thérapeutique ?

QCM

NB. Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.

1. Les nombreux types cellulaires présents dans le sang d'un mammifère adulte dérivent

- a) d'un seul type de cellule souche multipotente située dans la moelle osseuse
- b) de cellules différenciées qui se mettent en place dans le foie fœtal, mais qui résident ensuite dans la moelle osseuse
- c) de la division de cellules différenciées circulantes dans le sang
- d) de cellules souches qui s'engagent vers chaque type spécifique de cellule sanguine pendant le développement embryonnaire

2. Quelles seraient les conséquences de l'invalidation de G-CSF chez une souris ?

- a) La souris serait incapable de produire des granulocytes.
- b) La souris serait incapable de produire des macrophages.
- c) La souris serait dépourvue d'érythrocytes.
- d) La souris perdrait complètement sa population de cellules souches hématopoïétiques.

3. Dans quelle couche de l'épiderme les cellules souches responsables du renouvellement des kératinocytes de la peau sont-elles situées ?

- a) lame basale
- b) couche basale
- c) derme
- d) couche des kératinocytes
- 4. La transfection de *myoD* dans des fibroblastes induira
- a) une apoptose
- b) un engagement dans la lignée myéloïde
- c) une différenciation en cellules musculaires
- d) une formation d'érythrocytes

5. La différenciation, en opposition à la détermination, des cellules musculaires dépend de

- a) Mrf4
- b) Myf5

- c) MyoDd) myogénine
- i) myogennie
- **6.** Que sont les cellules satellites ?
- a) Des cellules circulantes en orbite dans le sang.
- b) Des cellules souches musculaires.
- c) Des cellules de soutien musculaire, comme les cellules gliales sont les cellules de soutien associées aux neurones.
- d) Des cellules souches nerveuses.

7. Si le cristallin de l'œil est retiré chez un individu adulte, quels organismes dans la liste suivante sont capables de produire un nouveau cristallin par transdifférenciation de cellules de l'iris ?

- a) le poulet
- b) l'homme
- c) la souris
- d) le triton
- 8. Les cellules ES sont
- a) des cellules isolées à partir d'un tératocarcinome
- b) des cellules souches embryonnaires dérivées de la masse cellulaire interne de l'embryon de mammifère
- c) des cellules souches épidermiques situées dans la couche basale de l'épiderme
- d) des cellules souches humaines générées par traitement de types cellulaires matures avec une combinaison spécifique de facteurs de transcription
- 9. Les cellules épiSC sont
- a) Des cellules souches épidermiques dérivées de l'épiderme embryonnaire.
- b) Des cellules souches obtenues par reprogrammation, qui sont différentes des cellules souches embryonnaires.
- c) Des cellules souches embryonnaires issues de l'épiblaste embryonnaire.
- d) Des cellules épidermiques déterminées pour la réparation tissulaire.

10. Quel cocktail de facteurs de transcription (« facteurs de Yamanaka ») peut être utilisé pour générer des cellules iPS ?

- a) Oct4, Nanog, Smad et Cdx2
- b) Gata4, Nanog, Gli et Cdx2
- c) Oct4, Nanog, Sox2 et Myc
- d) Oct4, Sox2, Gata4 et Rb

Réponses des QCM

1 : a, 2 : a, 3 : b, 4 : c, 5 : d, 6 : b, 7 : d, 8 : b, 9 : c, 10 : c

Références bibliographiques

8.1 Le contrôle de la transcription implique des régulateurs transcriptionnels généraux et tissu-spécifique

Buecker, C., Wysocka, J. : Enhancers as information integration hubs in development : lessons from genomics. *Trends Genet*. 2012, 28 : 276–284.

- Levine, M., Tjian, R. : **Transcription regulation and animal diversity**. *Nature* 2003, **424** : 147–151.
- Mannervik, M., Nibur, Y., Zhang, H., Levine, M. :
 - **Transcriptional coregulators in development**. *Science* 1999, **284 :** 606–609.
- Spitz, F., Furlong, E.E. : Transcription factors : from enhancer binding to developmental control. Nat. Rev. Genet. 2012, 13 : 613–626.

8.2 L'expression des gènes est aussi contrôlée par des modifications chimiques et structurales de l'ADN et des protéines histones, qui modifient la structure de la chromatine

&

8.3 Les profils d'activité génique peuvent être transmis grâce à la persistance de protéines régulatrices ou par le maintien des modifications de la chromatine

- Cheung, W.L., Briggs, S.D., Allis, C.D. : Acetylation and chromosomal functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000, **12** : 328–333.
- de Laat, W., Grosveld, F. : **Spatial organization of gene** expression : the active chromatin hub. *Chromosome Res.* 2003, 11 : 447–459.
- Ho, L., Crabtree, G.R. : Chromatin remodelling during development. *Nature* 2010, **463** : 474–484.

ENCART 8A Contrôle épigénétique de l'expression génique par des modifications de la chromatine

Soshnikova, N., Duboule, D. : Epigenetic temporal control of mouse Hox genes in vivo. Science 2009, 324 : 1320–1323.

8.4 Des signaux extracellulaires peuvent déclencher les changements de profils d'activité génique lors de la différenciation

Barolo, S., Posakony, J. Three habits of highly effective signaling pathways : principle of transcriptional control

- by developmental cell signalling. *Genes Dev.* 2002, 16: 1167–1181.
 Brivanlou, A.H., Darnell, J.E. : Signal transduction and control of gene expression. *Science* 2002, 295 : 813–818.
- Dougherty, D.C., Park, H.M., Sanders, M.M. : Interferon regulatory factors (IRFs) repress transcription of the chicken ovalbumin gene. *Gene* 2009, 439 : 63–70.

8.5 La différenciation musculaire est déterminée par la famille de facteurs de transcription MyoD

- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., Tajbakhsh, S. : Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5 : MyoD double-mutant mice. Nature 2004, 431 : 466–471.
- Tapscott, S.J. : The circuitry of a master switch : MyoD and the regulation of skeletal muscle transcription. *Development* 2005, 132 : 2685–2695.

8.6 La différenciation musculaire implique une sortie du cycle cellulaire mais est réversible

- Deato, M.D., Tjian, R. : An unexpected role of TAFs and TRFs in skeletal muscle differentiation; switching of core promoter complexes. *Cold Spring Harb. Symp.* 2008, 73 : 217–225.
- Novitch, B.G., Mulligan, G.J., Jacks, T., Lassar, A.B. : **Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G**₂ **phases of the cell cycle**. *J. Cell Biol.* 1996, **135** : 441–456.
- Odelberg, S.J., Kolhoff, A., Keating, M. : **Dedifferentiation of** mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell* 2000, **103** : 1099–1109.

8.7 Toutes les cellules sanguines dérivent de cellules souches multipotentes

Ema, H., Nakauchi, H. : Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003, 13 : 508–512.

- Phillips, R.L., Ernst, R.E., Brunk, B., Ivanova, N., Mahan, M.A., Deanehan, J.K., Moore, K.A., Overton, G.C., Lemischka, I.R. : The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 2000, 288 : 1635–1640.
- Zon, L.I. : Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stemcell renewal. *Nature* 2008, **453** : 306–313.

8.8 Des facteurs intrinsèques et extrinsèques contrôlent la différenciation des lignées hématopoïétiques

- Anguita, E., Hughes, J., Heyworth, C., Blobel, G.A., Wood, W.G., Higgs, D.R. : Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J.* 2004, 23 : 2841–2852.
- Kluger, Y., Lian, Z., Zhang, X., Newburger, P.E., Weissman, S.M. : A panorama of lineage-specific transcription in hematopoiesis. *BioEssays* 2004, 26 : 1276–1287.
- Metcalf, D. : Control of granulocytes and macrophages : molecular, cellular, and clinical aspects. *Science* 1991, **254** : 529–533.
- Orkin, S.H. : Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev. Genet.* 2000, **1** : 57–64.

8.9 L'expression du gène de la globine au cours du développement est contrôlée par des séquences régulatrices très éloignées des régions codantes

Engel, J.D., Tanimoto, K. : Looping, linking, and chromatin activity : new insights into β -globin locus regulation. *Cell* 2000, 100 : 499–502.

Tolhuis, B., Palstra, R.J., Splinter, E., Grosveld, F., de Laat, W. : Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol. Cell* 2002, **10** : 1453–1465.

8.10 L'épiderme de la peau des mammifères adultes est continuellement remplacé par des cellules issues de cellules souches

- Clayton, E. *et al.* : A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 2007, **446** : 185–189.
- Coulombe, P.A., Kerns, M. L., Fuchs, E. : Epidermolysis bullosa simplex : a paradigm for disorders of tissue fragility. J. Clin. Invest. 2009, 119 : 1784–1793.
- Fuchs, E. : The tortoise and the hair : slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell* 2009, **137** : 811–819.
- Fuchs, E. : Finding one's niche in the skin. *Cell Stem Cell* 2009, **4**: 499–502.
- Fuchs, E., Nowak, J.A. : Building epithelial tissues from skin stem cells. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2008, 73 : 333–350.
- Jones, P.H., Simons, B.D., Watt, F.M. : Sic transit gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell? *Cell Stem Cell* 2007, 1: 371–381.

Mascré, G. *et al.* : Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature* 2012, 489 : 257–262.

Schepeler, T., Page, M.E., Jensen, K.B. : Heterogeneity and plasticity of epidermal stem cells. *Development* 2014, 141 : 2559–2567.

8.11 Les cellules souches utilisent différentes modalités de division pour entretenir les tissus

Li, X., Upadhyay, A.K., Bullock, A.J., Dicolandrea, T., Xu, J., Binder, R.L., Robinson, M.K., Finlay, D.R., Mills, K.J., Bascom, C.C., Kelling, C.K., Isfort, R.J., Haycock, J.W., MacNeil, S., Smallwood, R.H. : **Skin stem cell hypotheses and long term clone survival explored using agent-based modeling**. *Sci. Rep.* 2013, **3** : 1904.

Mascré, G., Dekoninck, S., Benjamin Drogat, B., Youssef, K.K., Brohée, S., Sotiropoulou, P.A., Simons, B.D., Blanpain, C. : **Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance**. *Nature* 2012, **489 :** 257–262.

Simons, B.D., Clevers, H. : Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* 2011, 145 : 851–862.

8.12 Le revêtement intestinal : un autre exemple d'épithélium à renouvellement continu

Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, Andrea, Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., Clevers, H. : **Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene** *Lgr5*. *Nature* 2007, **449** : 1003–1008.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H.: Single *Lgr5* stem cells build crypt villus structures *in vitro* without a mesenchymal cell niche. *Nature* 2009, 459 : 262–265.

Van der Flier, L.G., Clevers, H. : Stem cells, self-renewal and differentiation in the intestinal epithelium. Annu. Rev. Physiol. 2009, 71 : 241–260.

8.13 Les cellules musculaires squelettiques et les cellules nerveuses peuvent être renouvelées à partir de cellules souches chez l'adulte

Collins, C.A., Partridge T.A. : **Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell**. *Cell Cycle* 2005, **4** : 1338–1341.

Dhawan, J., Rando, T.A. : **Stem cells in postnatal myogenesis : molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment**. *Trends Cell Biol*. 2005, **15 :** 663–673.

Kemperman, G. : New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012, **13 :** 727–736.

Lepper, C., Conway, S.J., Fan, C.M. : Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* 2009, **460** : 627–631.

Li, G., Pleasure, S.J. : **Ongoing interplay between the neural network and neurogenesis in the adult hippocampus**. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2010, **20 :** 126–133.

Lie, D-C., Colamarino, S.A., Song, H-J., Desire, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearier, A.R., Gage, F.H. : Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 2005, **437** : 1370–1375.

Ninkovic, J., Gotz, M. : **Signaling in adult neurogenesis : from stem cell niche to neuronal networks**. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007, **17 :** 338–344.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., Buckingham, M.A. : *pax3/pax7* dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 2005, **435** : 948–953.

Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S., Blau, H.M. : **Selfrenewal and expansion of single transplanted muscle stem cells**. *Nature* 2008, **456** : 502–506.

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., Frisén J. : Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013, 153 : 1219–1227.

8.14 Les cellules souches embryonnaires prolifèrent, peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires en culture et contribuent au développement normal *in vivo*

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B.,
Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., Smith,
A. : Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007, 450 : 1230–1234.

Kojima, Y., Kaufman-Francis, K., Studdert, J.B., Steiner, K.A., Power, M.D., Loebel, D.A., Jones, V., Hor, A., de Alencastro, G., Logan, G.J., Teber, E.T., Tam, O.H., Stutz, M.D., Alexander, I.E., Pickett, H.A., Tam, P.P. : The transcriptional and functional properties of mouse epiblast stem cells resemble the anterior primitive streak. *Cell Stem Cell* 2013, 14 : 107–120.

Silva, J., Chambers, I., Pollard, S., Smith, A. **Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion**. *Nature* 2006, **441** : 997–1001.

West, J.A., Daley, G.Q. : *In vitro* gametogenesis from embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004, 16: 688–692.

Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., Smith, A. : The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008, 453 : 519–523.

Young, R. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 2011, **144**: 940–954.

ENCART 8B. L'isolement et la culture de cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES)

Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., Smith, A. : Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. Nat. Cell Biol. 2011, 13 : 838–845.

8.15 Les noyaux de cellules différenciées peuvent orchestrer un développement

Eggan, K., Baldwin, K., Tackett, M., Osborne, J., Gogos, J., Chess, A., Axel, R., Jaenisch, R. : Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 2004, **428** : 44–49.

Gurdon, J.B. : Nuclear transplantation in eggs and oocytes. J. Cell Sci. Suppl. 1986, 4 : 287–318.

Gurdon, J.B., Melton, D.A. : Nuclear reprogramming in cells. Science 2008, **322 :** 1811–1815.

Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Friedman, A., Hochedlinger, K., Yanagimachi, R., Lander, E.S., Golub, T.R., Jaenisch, R. : Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002, **99 :** 12889–12894.

Rhind, S.M., Taylor, J.E., De Sousa, P.A., King, T.J., McGarry, M., Wilmut, I. : **Human cloning : can it be made safe?** *Nat. Rev. Genet.* 2003, **4 :** 855–864.

Wilmut, I., Taylor, J. : **Primates join the club**. *Nature* 2007, **450** : 485–486.

8.16 Le profil d'activité génique des cellules différenciées peut être modifié par fusion cellulaire

- Blau, H.M. : How fixed is the differentiated state? Lessons from heterokaryons. *Trends Genet*. 1989, **5** : 268–272.
- Blau, H.M., Baltimore, D. : **Differentiation requires continuous** regulation. *J. Cell Biol.* 1991, **112 :** 781–783.

Nichols, J., Smith, A. : The origin and identity of embryonic stem cells. *Development* 2011, 138 : 3–8.

Blau, H.M., Blakely, B.T. : **Plasticity of cell fates : insights from** heterokaryons. *Cell Dev. Biol.* 1999, **10 :** 267–272.

Pomerantz, J.H., Mukherjee, S., Palermo, A.T., Blau, H.M. : **Reprogramming to a muscle fate by fusion recapitulates differentiation**. *J. Cell Sci.* 2009, **122** : 1045–1053.

8.17 L'état différencié d'une cellule peut changer par transdifférenciation

Eguchi, G., Eguchi, Y., Nakamura, K., Yadav, M.C., Millán, J.L., Tsonis, P.A. : Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing. *Nat. Commun.* 2011, **2** : 384.

Horb, M.E., Shen, C.N., Tosh, D., Slack, J.M. : **Experimental** conversion of liver to pancreas. *Curr. Biol.* 2003, **13** : 105–115.

Jarriault, S., Shwab, Y., Greenwald, I.A. : *Caenorhabitis elegans* model for epithelial-neuronal transdifferentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008, **105** : 3790–3795.

Slack, J.M.W. : Metaplasia and transdifferentiation from pure biology to the clinic. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007, 8: 369–378.

Tsonis, P.A., Madhavan, M., Tancous, E.E., Del Rio-Tsonis, K. : A newt's eye view of lens regeneration. Int. J. Dev. Biol. 2004, 48 : 975–980.

8.18 Les cellules souches pourraient être une clé de la médecine régénérative

Jaenisch, R. : Human cloning—the science and ethics of nuclear transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2004, **351** : 2787–2792.

McClaren, A. : Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 2001, **414 :** 129–131.

Pera, M.F., Trounson, A.O. : Human embryonic stem cells : prospects for development. *Development* 2004, 131 : 5515–5525.

Pomerantz, J., Blau, H.M. : Nuclear reprogramming : a key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat. Cell Biol.* 2004, 6 : 810–816.

Rolletschek, A., Wobus, A.M. : Induced human pluripotent stem cells : promises and open questions. *Biol. Chem.* 2009, **390** : 845–849.

Schwartz, S.D., Hubschman, J.P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., Lanza, R. : Embryonic stem cell trials for macular degeneration : a preliminary report. *Lancet* 2012, 379 : 713–720.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Marti Gutierrez, N., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanaudomchai, H., Masterson, K., Larson, J., Eaton, D., Sadler-Fredd, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S., Stouffer, R.L., Wolf, D., Shoukhrat Mitalipov, S. : Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2013, 153 : 1228–1238.

Wurmer, A.E., Palmer, T.D., Gage, F.H. : Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 2004, **304** : 1253–1255.

Yechoor, V., Liu, V., Espiritu, C., Paul, A, Oka, K., Kojima, H., Chan, L. : **Neurogenin3 is sufficient for transdetermination** of hepatic progenitor cells into neo-islets *in vivo* but not transdifferentiation of hepatocytes. *Dev. Cell* 2009, **16**: 358–373.

ENCART 8C Ingénierie tissulaire et cellules souches

Gonfiotti, A., Jaus, M.O., Barale, D., Baiguera, S., Comin, C., Lavorini, F., Fontana, G., Sibila, O., Rombolà, G., Jungebluth, P., Macchiarini, P. : The first tissue-engineered airway transplantation : 5-year follow-up results. *Lancet* 2014, 383 : 238–244.

Jungebluth, P. *et al.* : Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite : a proof-ofconcept study. *Lancet* 2011, **378** : 1997–2004.

Macchiarini, P., Jungebluth, P., Go, T., Asnaghi, M.A., Rees, L.E., Cogan, T.A., Dodson, A., Martorell, J., Bellini, S., Parnigotto, P.P., Dickinson, S.C., Hollander, A.P., Mantero, S., Conconi, M.T., Birchall, M.A. : Clinical transplantation of a tissueengineered airway. *Lancet* 2008, 372 : 2023–2030.

ENCART 8D Les cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS))

Okita, I., Ichisaka, T., Yamanka, S. : Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007, 448 : 313–317.

Rolletschek, A., Wobus, A.M. : Induced human pluripotent stem cells: promises and open questions. *Biol. Chem.* 2009, **390** : 845–849.

Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, **126**: 663–676.

Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H.K., Nagy, A. : piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009, **458** : 766–770.

Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., Bradley, A. : Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat. Meth.* 2009, 6 : 363–369.

8.19 Des approches variées permettent d'obtenir des cellules différenciées utilisables en thérapie cellulaire

Chen, S., Borowiak, M., Fox, J.L., Maehr, R., Osafune, K., Davidow, L., Lam, K., Peng, L.F., Schreiber, S.L., Rubin, L.L., Melton, D. : A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat. Chem. Biol.* 2009, 5 : 258–265.

Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Goland, R., Leibel, R.L., Melton, D.A. : Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc. Natl Acad. Sci.* USA 2009, 106 : 15768–15773.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., Melton, D.A. : *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to betacells. *Nature* 2008, 455 : 627–632.

9

La morphogenèse : modification de formes dans l'embryon

- Adhérence cellulaire
- Clivage et formation de la blastula
- Mouvements de la gastrulation
- Formation du tube neural
- Migration cellulaire
- Dilatation dirigée

Les modifications de forme des embryons animaux sont dues à des forces cellulaires liées, entre autres, aux divisions cellulaires, aux modifications de morphologie cellulaire, aux réarrangements de cellules au sein des tissus et aux migrations de cellules, individuellement ou en groupe. Ces forces cellulaires sont en général générées au sein d'épithéliums, par la contraction du cytosquelette cellulaire, la réaction à ces forces impliquant la structure de la cellule elle-même et les interactions qu'elle développe avec les cellules voisines et/ou le matériel extracellulaire qui les maintient en tissus. La division, la migration cellulaire et la mise en place d'une pression hydrostatique au sein d'une structure jouent également un rôle dans les processus morphogénétiques. Au cours de l'embryogenèse précoce, le principal événement morphogénétique est la gastrulation : elle correspond à une réorganisation majeure des cellules en tissus. D'autres exemples seront discutés dans ce chapitre, comme la formation de la chorde, du tube neural et la migration des cellules des crêtes neurales.

Jusqu'ici, le développement précoce a été étudié essentiellement sous l'angle des mécanismes de la détermination des cellules résultant de l'expression de gènes différents dans des populations cellulaires particulières. Dans ce chapitre, une perspective différente du développement est envisagée avec la genèse des formes ou **morphogenèse**. Tous les embryons subissent des modifications drastiques de forme au cours de leur développement précoce. La principale est la gastrulation, qui transforme deux couches cellulaires uniformes en un agencement tridimensionnel de cellules d'identités différentes. La gastrulation implique des réarrangements cellulaires importants ainsi que des mouvements cellulaires orientés ; chez les triploblastiques, il en résulte un agencement universel des cellules en trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) et une organisation antéro-postérieure (voir Fig. 4.37).

Si la mise en place de patrons peut être assimilée à une mise en couleur, la morphogenèse ressemble plus au modelage d'une masse d'argile en une forme reconnaissable. Fondamentalement, des cellules isolées ne peuvent pas par elles-mêmes réaliser une morphogenèse : seule l'organisation de ces cellules en tissus cohérents leur permet de coordonner leurs comportements et de générer les forces qui modèlent l'embryon. Une modification de forme se résume essentiellement à un changement de comportement de cellules individuelles, qui modifie le tissu dont elles font partie : c'est finalement un problème de mécanique cellulaire et tissulaire. Comprendre la morphogenèse implique de comprendre les forces à l'origine des modifications des formes et mouvements cellulaires, les supports moléculaires de ces forces et leur contrôle au cours du développement.

La mise en place des structures embryonnaires animales repose sur trois propriétés cellulaires principales. La première est l'adhésivité cellulaire, la tendance des cellules à rester cohésives. Dans les tissus, les cellules adhèrent entre elles et à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de protéines de surface cellulaire variées, connues sous le nom générique de molécules d'adhérence. Une modification de ces molécules peut entraîner une modification de l'intensité ou de la spécificité de l'adhérence cellulaire, avec des conséquences sur le tissu auquel ces cellules appartiennent.

La seconde propriété est la morphologie cellulaire. Les cellules peuvent modifier leur forme par des contractions internes actives. Ces modifications liées au fonctionnement du cytosquelette sont essentielles dans de nombreux processus au cours du développement. Par exemple, des modifications coordonnées de morphologie cellulaire au sein d'un feuillet cellulaire permettent son repliement ou la formation d'un tube, phénomènes très fréquents au cours du développement.

La troisième propriété est la **migration cellulaire**, capacité que montrent de nombreux types cellulaires à se déplacer, individuellement ou en groupe. Cette propriété est aussi essentielle : de nombreux processus au cours du développement impliquent des migrations coordonnées de cellules, qui sont guidées entre leur lieu d'origine et leur localisation finale.

L'organisation des cellules en tissus amplifie la portée des variations de ces trois propriétés cellulaires et permet des modifications à grande échelle. Au sein d'un tissu, la contraction ou l'augmentation du volume d'une cellule n'affecte pas que ses voisines, mais se répercute à distance sur plusieurs diamètres cellulaires. À l'inverse, le comportement cellulaire peut aussi être contrôlé par des signaux extracellulaires, chimiques ou mécaniques, issus des cellules voisines et de la matrice extracellulaire.

Les changements de forme et la migration des cellules sont liés à des modifications d'adhésivité cellulaire et il existe de nombreuses interactions entre les mécanismes moléculaires de l'adhérence cellulaire et ceux qui contrôlent le cytosquelette. Certaines molécules d'adhérence qui seront évoquées dans ce chapitre agissent aussi comme des récepteurs et participent à la transduction de signaux de l'environnement extracellulaire vers l'intérieur de la cellule, affectant en particulier le cytosquelette. L'adhésivité, la morphologie et la migration cellulaires peuvent ainsi être contrôlées de façon coordonnée à la fois par l'histoire cellulaire qui détermine, par exemple, quelles molécules d'adhérence sont mises en place, et par des signaux extracellulaires.

La pression hydrostatique est un autre facteur impliqué dans la morphogenèse, surtout chez les végétaux, même si elle agit aussi dans certains cas de l'embryogenèse animale. Elle est liée à l'osmose et à l'accumulation de liquides. Il n'y a pas de mouvements cellulaires au cours de la croissance chez les végétaux : seules des divisions orientées et des allongements cellulaires permettent les modifications morphologiques (voir Chapitre 7).

Les modifications de la forme d'un embryon sont donc la conséquence finale de l'expression spatio-temporelle de protéines qui contrôlent l'adhérence et la motilité cellulaires, l'orientation des divisions et la genèse d'une pression hydrostatique. La gastrulation, par exemple, peut être vue comme la mise en route d'une carte détaillée d'instructions qui a été progressivement mise en place sur une ébauche qu'est le très jeune embryon. Les processus précoces déterminent quelles cellules exprimeront les protéines nécessaires à la genèse et au contrôle des forces appropriées.

Dans ce chapitre, seront abordés quelques exemples de modifications morphologiques liées à la mise en place du plan d'organisation des animaux. Il sera d'abord précisé comment le clivage du zygote donne la forme simple de l'embryon précoce, dont le blastocyste de souris et les blastulas d'oursin ou d'amphibien sont de bons exemples. Puis seront étudiés les mouvements se produisant au cours de la gastrulation et de la neurulation, c'est-à-dire la formation du tube neural des vertébrés, qui impliquent le repliement de feuillets cellulaires et le réarrangement de couches cellulaires. Chez les vertébrés, la migration des cellules des crêtes neurales après la neurulation est à l'origine de structures variées au sein du tronc et de la tête, et sera évoqué comment ces cellules sont guidées vers leurs destinations finales. Enfin seront considérés le cas de la dilatation dirigée et du rôle moteur de la pression hydrostatique comme facteurs de modifications morphologiques. D'autres mécanismes morphogénétiques, comme la croissance, la prolifération et la mort cellulaires, sont étudiés à propos du développement d'organes particuliers et de la croissance de l'organisme dans son ensemble dans les Chapitres, 11, 12 et 13. Quelques aspects de la croissance des plantes sont abordés dans le Chapitre 7.

L'étude débutera ici en abordant les mécanismes de l'adhérence cellule/cellule et leur implication dans le maintien de l'individualisation des tissus.

Adhérence cellulaire

L'adhérence entre cellules et l'adhérence entre cellules et matrice extracellulaire, sont des éléments majeurs de contrôle du comportement cellulaire au cours de la morphogenèse et permettent la création de groupes de cellules réagissant de façon coordonnée. À l'inverse, un différentiel d'adhésivité permet l'individualisation de tissus et de structures.

Les cellules adhèrent entre elles par des **molécules d'adhérence cellulaire**. Ces protéines de surface cellulaire peuvent interagir avec des protéines de surface d'autres cellules ou avec des constituants matriciels (Encart 9A). Le jeu de molécules mis en place par une cellule détermine ses capacités d'adhérence. Bon nombre de phénomènes au cours du développement impliquent une modification de ce jeu. Dans le cas qui sera principalement évoqué ici, le tissu épithélial, les cellules sont maintenues jointives par des structures spécialisées, les **jonctions adhérentes**, dans lesquelles sont présentes des molécules d'adhérence.

La membrane cellulaire, au contact de l'environnement extracellulaire, est soumise à une tension superficielle. Cette tension est responsable de la forme sphérique des cellules isolées, comme les gouttes d'eau dans l'air, forme qui minimise l'énergie impliquée dans les interactions avec l'environnement. Elle est aussi à l'origine de la cohésion cellulaire : le regroupement d'un ensemble de cellules réduit la surface totale exposée et, en conséquence, la tension superficielle. Les interactions adhésives modifient la tension superficielle de la membrane, ce qui se traduit par un aplatissement cellulaire aux points de contacts entre cellules ou entre cellule et support. Deux liquides ayant des tensions superficielles différentes ne sont pas miscibles. Depuis longtemps, les embryologistes ont noté le comportement « liquide » des tissus lors de la gastrulation des amphibiens et décrit comment les feuillets embryonnaires se forment puis restent distincts, glissant les uns sur les autres en subissant des réarrangements internes qui modèlent l'embryon. L'hypothèse d'adhérence différentielle interprète cette dynamique « liquide » comme une conséquence des tensions superficielles et d'interface générées par les cellules, qui leur permet d'adhérer entre elles mais aussi de changer de forme ou de se déplacer.

9.1 La réagrégation de cellules dissociées démontre l'existence d'une adhésivité différentielle entre tissus distincts

La mise en présence de différents tissus dans un cadre expérimental *ex vivo* permet de suggérer l'existence de différences d'adhésivité cellulaire. Mis en contact, deux fragments d'endoderme précoce d'une blastula d'amphibien fusionnent et forment une sphère. Un fragment d'endoderme précoce et un fragment d'ectoderme précoce commencent à fusionner mais avec le temps, ils se séparent jusqu'à ce que seul un pont étroit les connecte (Fig. 9.1). Avec un fragment d'ectoderme précoce et un fragment de mésoderme précoce, le résultat est différent. En effet, ils restent en Fig. 9.1 Séparation de tissus embryonnaires aux propriétés d'adhérence différentes. Lorsque des fragments d'ectoderme précoce (en bleu) et d'endoderme précoce (en jaune) de blastula d'amphibien sont mis en contact, ils commencent à fusionner puis se séparent en ne laissant qu'une mince bande de tissus entre eux.



Fig. 9.2 Tri de différents types cellulaires. Un traitement par une solution alcaline permet de dissocier des fragments d'ectoderme (en bleu) et de mésoderme (en gris) de blastula d'amphibien en cellules isolées. Mélangées, ces cellules se regroupent par type, les cellules mésodermiques formant l'extérieur de l'agrégat.



contact et le mésoderme s'étale sur l'ectoderme et peut même finir par le couvrir totalement. C'est ce qui s'observe dans la blastula, où l'ectoderme et le mésoderme adhèrent l'un à l'autre, et ne se séparent pas comme le font l'ectoderme et l'endoderme.

Si les différents fragments sont dissociés en cellules isolées, puis que ces cellules sont mélangées, la réagrégation des cellules au sein du mélange se fait préférentiellement entre cellules de même origine. Par exemple, un mélange de cellules issues de l'ectoderme et du mésoderme d'une blastula âgée ou une gastrula d'amphibien se réorganise spontanément en ectoderme et mésoderme séparés. De plus, les cellules ectodermiques sont emballées par les cellules mésodermiques (Fig. 9.2), exactement comme dans le cas de la fusion des fragments tissulaires. Des expériences analogues ont produit le même résultat avec l'embryon de poisson-zèbre : les cellules ectodermiques sont au centre d'agrégats recouverts par les cellules endomésodermiques. De la même façon, des cellules de l'épiderme présomptif et de la plaque neurale présomptive d'amphibien, mélangées après dissociation, se réassocient par tissu d'origine. Dans ce cas, les cellules épidermiques sont finalement en surface de l'agrégat et emballent une masse de cellules nerveuses.

La répartition des cellules tend à minimiser l'énergie globale des interactions de surface au sein de l'agrégat. Elle est le résultat des différences d'adhérence et de tension superficielle entre les différents types cellulaires. Les cellules de type identique s'associent préférentiellement. Au cours du temps, les cellules dans l'agrégat échangent des adhérences de faible intensité contre des adhérences plus fortes : il en résulte des différences de tensions superficielles suffisantes pour provoquer un tri cellulaire au sein de l'agrégat, de la même façon que deux liquides non miscibles, comme l'huile et l'eau, se séparent après un mélange initial. Au fur et à mesure de l'établissement de contacts cellulaires stables, les tissus se réorganisent et la force des liaisons intercellulaires dans le système pris comme un tout est optimisée. En général, si l'adhérence entre cellules différentes est plus faible que la moyenne de celle existant entre cellules semblables, les cellules se répartissent par type et les cellules les plus adhésives constituent le cœur de l'agrégat. Ces cellules, qui présentent la plus forte tension superficielle, sont entourées par les cellules à plus faible tension superficielle.

Il faut souligner que les expériences *in vitro* sur cellules isolées ou fragments tissulaires précédemment décrites indiquent simplement les adhésivités et tensions superficielles de tissus séparés de l'embryon. Elles ne peuvent pas définir quel tissu sera intériorisé ou extériorisé dans l'embryon lui-même. En effet, dans un embryon, les tissus sont soumis aux contraintes pré-existantes issues du développement, qui définissent leur localisation ainsi que leurs propriétés adhésives et de tension de surface ; ils peuvent aussi interagir avec d'autres tissus. Ces expériences *in vitro* démontrent néanmoins que des différences d'adhésivité et de tension superficielle peuvent générer et stabiliser les limites entre tissus. De plus, il existe quelques exemples de ce type de réarrangement au cours du développement. Ainsi, dans



ENCART 9A Molécules d'adhérence cellulaire et jonctions cellulaires

Figure 1

Trois classes de molécules d'adhérence cellulaire sont particulièrement importantes au cours du développement (Figure 1). Les **cadhérines** sont des protéines transmembranaires qui, en présence d'ions calcium (Ca²⁺), interagissent avec des cadhérines présentées par d'autres cellules. L'adhésion cellule/ cellule calcium-indépendante implique des membres de la **superfamille des immunoglobulines**, dont la N-CAM (pour *Neural Cell-Adhesion Molecule*), initialement isolée à partir du tissu nerveux, est un exemple. Certains membres de cette superfamille, comme N-CAM, se lient à des molécules similaires sur d'autres cellules. D'autres interagissent avec une classe différente de molécules membranaires : les **intégrines**. Ces dernières servent également de récepteurs pour des molécules de la matrice extracellulaire et sont donc impliquées dans l'adhérence cellule/substrat.

Chez les vertébrés, une trentaine de cadhérines différentes ont été identifiées. Les cadhérines s'associent entre elles par un ou plusieurs sites localisés dans les 100 derniers acides aminés extracellulaires, en N-terminal. En général, une cadhérine se lie à une cadhérine de même type, mais aussi à quelques autres molécules différentes. Les cadhérines participent à des jonctions cellules/ cellules : **jonctions adhérentes** dans de nombreux tissus et **desmosomes** présents surtout dans les épithéliums. Les **hémidesmosomes** sont des jonctions impliquant les intégrines qui ancrent solidement les cellules épithéliales à la lame basale matricielle.

Lorsque des cellules s'approchent les unes des autres et se touchent, les cadhérines se rassemblent au site de contact. Elles interagissent avec le cytosquelette par l'intermédiaire de leur queue cytoplasmique et d'autres protéines, dont les caténines, et peuvent ainsi être impliquées dans une signalisation cellulaire vers le cytosquelette. Ce rôle des **caténines** α , β , et γ est distinct du rôle de régulation génique de la β -caténine (voir, par exemple, Section 4.2). L'interaction avec le cytosquelette est nécessaire pour une adhérence cellulaire forte. Sont impliqués dans les jonctions adhérentes, les filaments d'actine, et dans les desmosomes et hémidesmosomes, les filaments intermédiaires comme la kératine. La nectine, une protéine d'adhérence cellulaire de la superfamille des immunoglobulines, participe aussi à la formation des jonctions adhérentes dans les tissus de mammifères et interagit également avec le cytosquelette d'actine.

L'adhérence d'une cellule à la matrice extracellulaire, qui contient des protéines comme le collagène, la fibronectine, la laminine et la ténascine, mais aussi des protéoglycannes, est liée aux interactions entre les intégrines et ces molécules matricielles. Une molécule d'intégrine est constituée de deux sous-unités (α , β). Chez les vertébrés, 24 intégrines différentes sont connues, construites à partir de 8 sous-unités β et 19 sous-unités α différentes. De nombreuses molécules matricielles sont reconnues par plus d'une intégrine.

Les intégrines se lient à d'autres molécules par leur extrémité extracellulaire, mais leur extrémité cytoplasmique s'associe également aux filaments d'actine ou aux filaments intermédiaires du cytosquelette par l'intermédiaire de complexes protéiques de liaison. Ce lien permet aux intégrines de transmettre à la cellule des informations sur l'environnement extracellulaire, comme la composition de la matrice ou les contacts intercellulaires possibles. Les intégrines peuvent ainsi transmettre des signaux modifiant la forme, la motilité, le métabolisme ou la différenciation cellulaire. Ces molécules sont aussi impliquées dans l'adhérence cellule/cellule, soit en interagissant avec des molécules d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines, soit par l'intermédiaire de ligands extracellulaires partagés entre cellule.

La **jonction serrée** est un troisième type de jonction cellulaire, présent dans certains épithéliums Elle empêche le passage entre les cellules épithéliales de l'eau ou d'autres molécules. Des rangées multiples de protéines transmembranaires (claudine, occludine) situées dans les membranes adjacentes forment un scellement continu qui ceinture la face apicale de la cellule (voir Fig. 9.13). l'embryon précoce de souris, le plan d'organisation est généré par le tri de différents types cellulaires plutôt que par l'utilisation d'informations positionnelles (voir Section 5.2).

9.2 Les cadhérines permettent une adhésivité sélective

La variabilité de l'adhésivité entre cellules est due à des différences concernant les types et le nombre de molécules d'adhérence présentes à la surface cellulaire. Les principales molécules d'intérêt pour ce chapitre sont présentées dans l'Encart 9A. Les **cadhérines**, dont la fonction est calcium-dépendante, participent à la construction de jonctions adhérentes, particulièrement importantes dans le maintien des tissus épithéliaux. Il existe de nombreuses formes de cadhérines, certaines étant spécifiques de types cellulaires. La démonstration du rôle des cadhérines dans la spécificité de l'adhérence cellulaire a été faite lors d'expériences qui mélangeaient des cellules exprimant des cadhérines différentes. Des fibroblastes de la lignée cellulaire murine L n'expriment pas de cadhérines à leur surface et n'adhèrent pas fortement entre eux. Si le gène codant la E-Cadhérine, est transfecté dans des cellules L et s'y exprime, les cellules qui mettent en place la cadhérine à leur surface adhèrent fortement et forment une structure rappelant un épithélium. L'adhérence est calcium-dépendante et donc dépend bien de la cadhérine ; elle est directement liée à cette dernière puisque les cellules L n'exprimant pas la cadhérine n'adhèrent pas à l'ensemble.

Si des populations de cellules L sont transfectées avec différentes cadhérines et mélangées en suspension, seules les cellules exprimant la même cadhérine adhèrent fortement entre elles : les cellules exprimant la E-cadhérine adhèrent bien aux cellules exprimant la E-cadhérine, mais très peu aux cellules exprimant la P- ou la N-cadéhrine. La quantité de cadhérines présente à la surface cellulaire module aussi l'adhésivité : les cellules présentant la plus forte expression de surface se retrouvent à l'intérieur des agrégats, recouvertes par les cellules qui ont une expression moindre (Fig. 9.3). Une différence quantitative de molécules d'adhérence cellulaire peut donc être à l'origine d'une adhésivité cellulaire différentielle.

Les molécules de cadhérine se lient par leur domaine extracellulaire, dont la structure est strictement calcium-dépendante, mais l'adhérence n'est pas exclusivement contrôlée par ces domaines. La partie cytoplasmique d'une cadhérine s'associe avec les filaments d'actine par l'intermédiaire d'un complexe protéique contenant les caténines α et β (voir Encart 9A). Cette association est nécessaire à la mise en place d'une adhérence forte : par le complexe cadhérine/caténine, une information passe de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, tout comme elle passe aussi de l'intérieur vers l'extérieur.

Dans les blastulas précoces de xénope, juste avant la gastrulation, la E-cadhérine est exprimée au niveau de l'ectoderme et la N-cadhérine apparaît dans le territoire présomptif de la plaque neurale. Si, après injection d'ARNm modifiés, de la



Fig. 9.3 Tri de cellules portant des quantités de molécules d'adhérence différentes à leur surface. Mélangées, des cellules exprimant différents niveaux de N-cadhérine à leur surface se regroupent, celles qui en expriment le plus intensément (en vert) formant le centre de l'agrégat.

Photographie aimablement communiquée par M. Steinberg, d'après Foty, R.A., and Steinberg, M.S. : **The differential adhesion hypothesis : a direct evaluation**. Developmental Biology 2005, **278 :** 255-263. E-cadhérine dépourvue de domaine extracellulaire est produite dans les blastulas, les cadhérines mutantes entrent en compétition avec les cadhérines endogènes intactes : elles ne modifient pas l'adhérence extracellulaire entre cadhérines, puisqu'elles n'ont pas de domaine extracellulaire, mais elles perturbent la liaison au cytosquelette. On constate que l'ectoderme perd sa cohésion au cours de la gastrulation, ce qui démontre qu'une cadhérine doit interagir avec une cadhérine d'une autre cellule et avec le cytosquelette de sa propre cellule pour mettre en place une adhérence stable. La liaison initiale des domaines extracellulaires transmet un signal au cytosquelette, qui stabilise l'interaction. Les éléments du cytosquelette sont décrits dans l'Encart 9B.

9.3 La conversion d'un tissu épithélial en tissu mésenchymateux (et *vice versa*) implique des modifications de l'adhérence cellulaire

La morphogenèse est rendue possible par les interactions entre et au sein de deux types d'architectures supra-cellulaires : épithéliale et mésenchymateuse. Dans un épithélium, des jonctions adhérentes maintiennent les cellules étroitement serrées entre elles : elles forment un feuillet continu. Un mésenchyme a une organisation bien plus lâche. Les liaisons entre cellules mésenchymateuses sont plus faibles et, dans certains cas, les cellules ne présentent pas de jonctions d'adhérence matures. Souvent, elles sont emballées dans la matrice extracellulaire, établissent des contacts par des ponts cytoplasmiques fins et se connectent par des **jonctions communicantes jonctions (gap)**. Ces pores protéiques, présents également au niveau des cellules épithéliales, sont situés dans les membranes de cellules adjacentes et permettent le passage direct d'ions ou de petites molécules d'un cytoplasme à l'autre.

Au sein des tissus différenciés, les épithéliums assurent habituellement des fonctions de barrière. Dans l'embryon, ils forment les structures dynamiques et transitoires déjà vues dans les chapitres précédents. Le premier événement morphogénétique embryonnaire est la formation d'un épithélium. Les épithéliums sont des sources d'émergence de différents types cellulaires ; ils peuvent aussi être remodelés sous différentes formes par l'activité de leurs propres cellules.

La conversion d'un épithélium en une masse mésenchymateuse, voire en cellules mésenchymateuses individualisées et capables de migrer, est un événement fréquent au cours du développement. Cette **transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)** implique la disparition des structures d'adhérence dont les jonctions adhérentes entre cellules (Fig. 9.4). Des exemples de TEM ont été vus lors de la gastrulation de la drosophile (voir Section 2.2), et de l'oursin (voir Section 6.9), mais aussi du poulet et de la souris chez lesquels les cellules de l'épiblaste quittent l'épithélium et pénétrent dans l'embryon au niveau de la ligne primitive (voir Chapitre 3). Dans ce chapitre, seront étudiés plus en détail les mécanismes de la TEM à travers ces exemples.

Le processus inverse, la **transition mésenchymo-épithéliale (TME)**, se manifeste aussi lors de l'embryogenèse. Par exemple, le mésoderme mésenchymateux se condense en massifs épithéliaux pour former les somites (voir Chapitre 5) ou en tubes épithéliaux pour former les vaisseaux sanguins ou les tubules rénaux. Cette transition



Fig. 9.4 Transition épithéliomésenchymateuse. La conversion d'un épithélium en un mésenchyme à l'organisation plus lâche est courante au cours de l'embryogenèse. Elle implique la disparition des jonctions adhérentes entre cellules épithéliales voisines, le détachement des cellules de la lame basale et leur conversion par étapes en cellules mésenchymateuses individuelles ou peu adhérentes entre elles.

ENCART 9B Cytosquelette, modification de forme et mouvement cellulaire

Les cellules peuvent changer profondément de forme au cours du développement, par exemple lors de la migration cellulaire ou de l'invagination d'un feuillet épithélial. Les modifications de forme sont générées par le cytosquelette, une charpente protéique intracellulaire qui contrôle également les mouvements. Le cytosquelette est constitué de trois types de polymères protéiques (filaments d'actine ou microfilaments, microtubules et filaments intermédiaires) associés à de nombreuses protéines. Les microfilaments et les microtubules sont des structures dynamiques, dont la polymérisation et la dépolymérisation sont contrôlées par les cellules. Les filaments intermédiaires sont plus stables et forment des structures filamenteuses qui transmettent les contraintes, répartissant les stress et assurant une résistance mécanique aux cellules. Les microtubules ont un rôle important dans le maintien de l'asymétrie et de la polarité cellulaire, et constituent des voies le long desquelles des protéines motrices transportent d'autres molécules ou des organites. Ils forment aussi les fuseaux des divisions cellulaires, supports de la ségrégation chromosomique. La polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine permettent des modifications de forme et des mouvements cellulaires ; de plus, les filaments d'actine s'associent avec la myosine, une protéine motrice, pour former des faisceaux contractiles d'actomyosine, principaux responsables des contractions génératrices de forces dans les cellules.

Les fins filaments d'actine (7 nm de diamètre) sont des polymères d'actine, une protéine globuleuse. Ils sont organisés en faisceaux et en réseaux tridimensionnels, en général situés juste sous la membrane plasmique, formant un cortex gélatineux. De nombreuses protéines associées aux microfilaments permettent de les maintenir en faisceau, de les associer en réseau, de contrôler leur polymérisation/dépolymérisation. Les microfilaments peuvent polymériser et dépolymériser très rapidement à partir d'actine globuleuse, ce qui fournit aux cellules un moyen de contrôle très versatile de l'intensité et de la localisation de l'assemblage des filaments d'actine. La cytochalasine D, une drogue d'origine fongique, provoque la déstabilisation des microfilaments et empêche la polymérisation de l'actine. Elle est très utilisée pour étudier le rôle des microfilaments. Les filaments d'actine peuvent construire avec la myosine des structures contractiles qui agissent comme des muscles miniatures. Par exemple, la contraction de l'anneau contractile (des faisceaux d'actomyosine formant un anneau dans le cortex cellulaire) est à l'origine de la constriction des cellules animales lors de la division cellulaire (Figure 1, à gauche). La contraction d'un anneau similaire autour de l'extrémité apicale d'une cellule provoque une constriction apicale et une élongation de la cellule (Figure 1, au centre).

De nombreuses cellules embryonnaires peuvent migrer sur un substrat solide, comme la matrice extracellulaire. Pour cela, elles utilisent une fine lame de cytoplasme, le lamellipode (Figure 1, droite) ou de longues et fines extensions cytoplasmiques, les filopodes. Ces structures temporaires sont mises en place grâce à l'assemblage de microfilaments. La présence du réseau d'actomyosine au front cellulaire joue un rôle dans le déplacement de la cellule : par l'intermédiaire des contacts focaux, points ancrant les filopodes ou le lamellipode au substrat, le système contractile peut exercer sur ce dernier une force permettant la progression de la cellule. Au niveau des contacts focaux (voir Encart 9A), les intégrines adhèrent à la matrice extracellulaire par leurs extrémités extracellulaires et fournissent un point d'ancrage aux microfilaments par leurs domaines cytoplasmiques. Elles assurent aussi une transduction des signaux de la matrice extracellulaire à travers la membrane, qui permet à la cellule d'être informée sur l'environnement qui l'entoure et d'ajuster ses mouvements en conséquence.

Les petites protéines G, GTPases monomériques de la famille Rho dont Rho, Rac et Cdc42, sont des régulateurs importants du cytosquelette d'actine. Rac est nécessaire à l'extension des lamellipodes et Cdc42 au maintien de la polarité cellulaire. Rho est impliqué dans la signalisation responsable des phénomènes de polarité cellulaire planaire (voir Encart 9C). Les signaux de l'environnement relayés par les protéines de la famille Rho vers le cytosquelette peuvent donc contrôler le mouvement cellulaire.



Figure 1

implique la formation de jonctions adhérentes entre cellules. Plus tard, au cours du développement, les cellules des somites subiront des TEM pour donner naissance notamment aux myoblastes.

RÉSUMÉ

L'adhérence des cellules entre elles et à la matrice extracellulaire maintient l'intégrité des tissus et leurs limites. Les associations entre cellules sont déterminées par les molécules d'adhérence cellulaire que ces cellules expriment à leur surface : les cellules portant des molécules différentes, ou des quantités variables d'une même molécule se séparent en populations distinctes. Ce résultat est la conséquence des effets de l'adhésivité cellulaire sur le cytosquelette cortical, et donc sur la tension de surface cellulaire et la tension des interfaces entre tissus.

L'adhérence intercellulaire est principalement liée à deux classes de protéines de surface : les cadhérines, qui interagissent de façon calcium-dépendante avec des cadhérines identiques portées par une autre surface cellulaire, et des membres de la superfamille des immunoglobulines, qui interagissent de façon calcium-indépendante avec des molécules similaires pour certains, avec des molécules différentes, comme des intégrines, pour d'autres. L'adhérence à la matrice extracellulaire est assurée par les intégrines, une troisième classe de molécule d'adhérence. La mise en place d'une adhérence stable par des cadhérines implique un contact physique extracellulaire entre les domaines externes des cadhérines de cellules adjacentes et une connexion des domaines intracellulaires des cadhérines avec le cytosquelette cellulaire via un complexe protéique contenant des caténines. De par cette connexion, les molécules d'adhérence peuvent transmettre des signaux de l'environnement extracellulaire au cytosquelette et induire, par exemple, des modifications de forme cellulaire. La transition épithélio-mésenchymateuse, passage d'une structure épithéliale bien organisée à un mésenchyme qui l'est moins, est un phénomène important de la morphogenèse. Elle implique la disparition des jonctions cellulaires. La transition mésenchymo-épithéliale, condensation de cellules mésenchymateuses en un épithélium, constitue la transformation inverse.

Clivage et formation de la blastula

La première étape du développement embryonnaire animal est la division de l'œuf fécondé en blastomères, qui conduit chez de nombreuses espèces à la constitution d'un ensemble cellulaire sous la forme d'une sphère creuse, la blastula (voir Chapitre 3). Dans les embryons précoces, le clivage (ou segmentation) implique une succession de cycles cellulaires courts, réduits à leurs phases S et M et sans période de croissance cellulaire. En conséquence, la masse de l'embryon n'augmente pas au cours du clivage.

Les modalités du clivage sont très variables en fonction des groupes animaux (Fig. 9.5). Au cours du **clivage radiaire**, les plans de clivage successifs sont perpendiculaires, les premières divisions donnant des blastomères situés juste les uns au-dessus des autres. Ce type de clivage est caractéristique des deutérostomiens, comme les oursins (voir Chapitre 6) et la majorité des vertébrés. Les œufs des mollusques et des annélides, des protostomiens, montrent un **clivage spiral** : les divisions successives se font dans des plans légèrement décalés et donnent une disposition des cellules en quinconce. Dans ces deux types de clivage, radiaire et spiral, certaines divisions peuvent être inégales. Ainsi, chez l'oursin, les trois premières divisions donnent des blastomères égaux puis la division suivante, inégale, forme des micromères, l'une des cellules filles étant plus petite que l'autre (voir Fig. 6.20). Chez les nématodes, dont le clivage est de type rotationnel, la première division est inégale (voir Fig. 9.5). Dans l'embryon de drosophile, les noyaux se divisent de façon répétée sans cytodiérèse, formant ainsi un syncytium. La séparation en cellules individualisées ne se





Fig. 9.6 Le fuseau mitotique. Le fuseau mitotique est une structure construite par la cellule qui répartit les chromosomes répliqués en deux lots identiques. Il est constitué de microtubules issus de deux centrosomes positionnés en regard l'un de l'autre et formant les deux pôles du fuseau. Les microtubules du fuseau croissent depuis chaque centrosome, se rencontrent et se chevauchent dans la zone médiane du fuseau. C'est à l'aplomb de cette zone médiane du fuseau que le sillon de division va se mettre en place. Les microtubules astériens ancrent chaque centrosome aux cortex cellulaire. Ils sont appelés ainsi car ils forment une structure étoilée, l'aster, à chaque pôle du fuseau. Pour simplifier, les chromosomes ne sont pas représentés ici.



produit que tardivement, avec une mise en place de membranes entre les noyaux (voir Section 2.1).

L'abondance des réserves vitellines dans l'œuf influence aussi le clivage. Pour les œufs riches en vitellus et à clivage égal, les sillons de division se mettent en place dans la région la moins chargée en réserve et s'étendent progressivement au sein de l'œuf, mais ils sont ralentis, voire arrêtés, par la présence du vitellus. Le clivage peut donc être incomplet, au moins pour un temps, chez ces embryons. Chez les oiseaux ou le poisson-zèbre dont les œufs sont extrêmement riches en réserves, les divisions complètes sont restreintes à une région sommitale de l'œuf et l'embryon se développe à la surface du vitellus (voir Figs. 3.13 et 3.15). Dans le cas des œufs d'amphibiens, moyennement riches en réserves, les divisions deviennent inégales et asynchrones au cours du clivage : la partie végétative de l'embryon, riche en réserves, est finalement composée de peu de cellules de grande taille en comparaison avec la partie animale, formée de nombreuses petites cellules.

Cette description soulève deux problèmes concernant le mécanisme des divisions précoces. Comment la position des plans de division est-elle déterminée ? Et comment le clivage conduit-il à une blastula creuse (ou son équivalent) possédant clairement une polarité intérieur-extérieur, la surface externe de la blastula étant très différente de la surface interne ?

9.4 L'orientation du fuseau mitotique détermine l'orientation du plan de division

La division cellulaire dépend de la formation du **fuseau mitotique**, une structure formée de microtubules issus de deux **centrosomes** situés aux deux pôles du fuseau. À mi-chemin entre les pôles, les extrémités des microtubules issus de chaque pôle se chevauchent et forment la **zone médiane du fuseau**. D'autres microtubules rayonnent à partir du centrosome, leur extrémité interagissant avec des moteurs molé-culaires protéiques au niveau du cortex cellulaire riche en actomyosine : ils forment un **aster** présent à chaque pôle (Fig. 9.6). Les chromosomes issus de la réplication sont attachés au fuseau et regroupés finalement dans la zone médiane, puis les chromatides de chaque chromosome sont réparties, une vers chaque pôle, par raccourcissement des microtubules qui les maintiennent. Deux nouveaux noyaux se forment et le cytoplasme se divise pour donner deux nouvelles cellules : le plan de division est situé à angle droit de l'axe du fuseau, au niveau de la zone médiane. Pour les

cellules animales, la division est réalisée par une constriction liée à l'activité d'un **anneau contractile** d'actomyosine, et la position du plan de division se matérialise à la surface cellulaire par un sillon de division (voir Encart 9B).

L'orientation et la position du plan de division sont très importantes pour le développement embryonnaire. Elles déterminent non seulement l'arrangement spatial des cellules filles entre elles et leurs tailles relatives, égales ou inégales, mais aussi la répartition de déterminants cytoplasmiques entre les cellules filles. La disposition de ce plan peut donc être à l'origine d'une différence de destinée cellulaire, comme par exemple dans le cas de la première division de clivage chez les nématodes (voir Section 6.1).

En général, l'orientation du plan de division suit la règle de Hertwig, proposée il y a plus d'un siècle : le fuseau s'oriente selon l'axe d'allongement de la cellule et la division a lieu perpendiculairement à cet axe. Toutes les cellules, même les cellules épithéliales, s'arrondissent pendant la division, ce qui devrait effacer les indications d'asymétrie et d'orientation. Cependant, une des hypothèses serait que le cytosquelette d'actine conserve en mémoire la forme initiale de la cellule en maintenant de fines fibres de rétraction reliées aux points originaux d'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire. Le fuseau serait donc guidé et orienté en fonction de cette trace, sous forme de fibres d'actine, de la morphologie de la cellule avant division. L'orientation du fuseau est particulièrement importante dans des cellules épithéliales car le plan de division doit être à angle droit de la surface épithéliale pour maintenir une couche cellulaire simple continue. La règle de Hertwig peut être outrepassée par des signaux qui, délivrés à travers le cytosquelette d'actine, orientent le fuseau dans une direction différente.

Pour de nombreuses espèces, l'embryon précoce est une blastula sous forme d'une sphère creuse, constituée par un feuillet épithélial délimitant une cavité remplie de liquide. La mise en place d'une telle structure à partir de l'œuf fécondé dépend de la configuration spatiale des divisions mais aussi de la façon dont les cellules se redisposent entre elles. Si le plan des divisions est toujours à angle droit de la surface et qu'elles ne changent pas de disposition, les cellules restent sous forme d'une simple couche (voir Fig. 9.7). Au cours du clivage, chaque cellule devient plus petite mais l'aire de la couche cellulaire augmente : un espace, le blastocœle, apparaît au centre, dont le volume s'accroît à chaque division. Ainsi se forme, par exemple la blastula d'oursin.

L'orientation du fuseau, et donc du plan de division, est déterminée par le comportement des centrosomes. Avant la mitose, le centrosome de la cellule est dupliqué. Les centrosomes fils se déplacent de part et d'autre du noyau en formant les asters, dont les interactions avec le cortex cellulaire ancrent et orientent le fuseau mitotique final. Habituellement, la configuration spatiale de la duplication et des mouvements des centrosomes se traduit par des plans de division successifs perpendiculaires entre eux. La division de la cellule AB formée à la suite de la première division du zygote chez les nématodes, en est un bon exemple : le fuseau de cette division est orienté



Fig. 9.7 Des divisions orientées convertissent une boule cellulaire en une blastula sphérique creuse. À gauche : si les cellules adjacentes d'un futur épithélium sont en contact par de larges domaines de leur surface cellulaire, comme dans le cas d'une très jeune blastula d'amphibien, l'agrégat cellulaire est de faible volume et la cavité centrale quasi inexistante. Au centre : une diminution de la surface de contact intercellulaire augmente le volume de la cavité interne (le blastocœle) et donc le volume total de la blastula, sans qu'il y ait eu modification du nombre ou du volume cellulaire. À droite : si des divisions radiaires augmentent le nombre de cellules et que la disposition des cellules ne change pas, le volume du blastocœle augmente, là encore sans augmentation de volume cellulaire.



Fig. 9.8 Le comportement des centrosomes détermine des plans de division dissemblables dans des cellules différentes. La première division du zygote des nématodes génère une cellule AB antérieure et une cellule P₁ postérieure. Dans la cellule AB, les centrosomes dupliqués se répartissent de telle sorte que le plan de segmentation de la division suivante sera à angle droit par rapport à celui de la première division. Dans la cellule P₁, les centrosomes se comportent de façon identique puis, avant la mitose, le noyau et les centrosomes subissent une rotation de 90° : le plan de division est le même que celui de la première division.

Illustration d'après Strome, S. : **Determination of cleavage planes**. Cell 1993, **72** : 3-6. à angle droit par rapport à celui de la première division du zygote (Fig. 9.8). Dans la cellule P_1 , sœur de AB lors de la première division du zygote, les centrosomes migrent comme dans la cellule AB mais l'ensemble centrosomes/noyau subit ensuite une rotation à 90° : la division de P_1 se fait dans le même plan de division que celui de la première division du zygote. L'orientation du plan de division dans ces cellules AB et P_1 est probablement sous le contrôle de facteurs cytoplasmiques, comme les protéines PAR, dont la distribution différentielle lors de la première division a un effet sur l'orientation du fuseau (voir Section 6.2).

La position des pôles du fuseau dépend d'un équilibre entre des forces contraires qui tendent à écarter et à rapprocher les centrosomes. Des protéines motrices associées aux microtubules ancrent les microtubules astériens dans le cortex cellulaire : leur activité tire les centrosomes vers la surface cellulaire. De façon similaire, des protéines motrices pontent les parties chevauchantes des microtubules du fuseau ; leur activité tend soit à rapprocher, soit à éloigner les pôles. La contraction ou le relâchement du cortex cellulaire riche en actomyosine influence aussi la position du fuseau dans la cellule par l'intermédiaire des microtubules astériens, qui peuvent transmettre les forces aux centrosomes et donc au fuseau.

9.5 La position du fuseau dans la cellule détermine les tailles relatives des cellules filles

En fonction de la position du sillon de division par rapport à l'axe de la cellule mère, les cellules filles sont de taille égale ou inégale. Si le fuseau de division est en position centrale et que chaque partie du fuseau est de taille égale, le plan de division sera équidistant des extrémités de la cellule et la division donnera deux cellules de même taille. Lorsque les deux cellules ont le même contenu et les mêmes potentialités, une telle division est appelée **division symétrique**. Lors d'une prolifération cellulaire, les divisions sont en général de ce type. Toutefois, en fonction de la localisation de déterminants cytoplasmiques dans la cellule mère, une division peut générer des cellules de taille identique mais avec des contenus différents, c'est-à-dire avec des potentialités différentes et donc avec des destinées distinctes. Du point de vue du développement, de telles divisions sont considérées comme des **divisions asymétriques**.

Si le fuseau n'est pas au centre de la cellule mère et/ou que l'une de ses parties s'étend et rend la structure asymétrique, la zone médiane du fuseau ne correspondra plus au milieu de l'axe d'allongement de la cellule et la division donnera deux cellules de taille inégale. Ces divisions sont en général, mais pas nécessairement, asymétriques et donnent des cellules filles à potentialités différentes du fait de la distribution différentielle de déterminants cytoplasmiques. La position du plan de division dépend des forces agissant sur les pôles du fuseau. Dans une division inégale, les forces sont équilibrées et le fuseau est symétrique. Dans une division inégale, des signaux issus du cortex à l'un des pôles de la cellule induisent une modification de position de ce pôle et donc une position asymétrique du fuseau (voir Fig. 6.6).



Des expériences anciennes sur le rôle du fuseau dans le contrôle de la division cytoplasmique ont utilisé de façon astucieuse des œufs d'oursin en cours de division pour modifier la position normale des fuseaux. Dans l'une de ces expériences, une bille de verre a été placée contre un œuf fécondé de façon à déplacer latéralement le fuseau et interrompre le premier sillon de division. Chaque bras de la cellule en fer à cheval créée par la division contient l'un des deux noyaux issus de la première mitose (Fig. 9.9). Lors de la division suivante, des fuseaux se forment normalement dans chaque bras du fer à cheval, prennent en charge les chromosomes et deux sillons de division apparaissent. Mais un troisième sillon se forme aussi entre les deux asters les plus hauts dans le fer à cheval, en absence locale de chromosomes.

Ces observations ont été initialement interprétées comme une démonstration d'un rôle des asters dans la formation du sillon de division, rôle indépendant du fuseau dont le signal passerait par le cortex. Toutefois, les microtubules issus des deux centrosomes impliqués s'étendent dans le cytoplasme jusqu'à la zone de ce sillon supplémentaire où ils peuvent interagir (voir Fig. 9.9). Cette zone d'interaction pourrait aussi être source d'un signal.

Par la suite, d'autres expériences ont également suggéré que la position du sillon de division peut être déterminée par des signaux issus de la zone médiane du fuseau, en dirigeant la formation d'un anneau contractile dans le cortex cellulaire le plus proche. Par exemple, une barrière physique placée entre la zone médiane du fuseau et le cortex bloque, dans l'œuf d'oursin comme dans des cellules cultivées de mammifère, la formation du sillon de division.

Les asters pourraient aussi influencer indirectement la position de l'anneau contractile. En amont de la mitose, la tension augmente dans le cortex cellulaire sous l'effet d'une contraction du cytosquelette, ce qui provoque l'arrondissement de la cellule. Il a été suggéré que l'interaction des microtubules astériens avec le cortex inhiberait la contraction du cortex dans les zones entourant les pôles, laissant une zone de plus grande contractibilité à mi-chemin entre les pôles, dans laquelle l'anneau contractile se formerait. Il est probable que le contrôle de la position de l'anneau contractile soit complexe, et dû à la combinaison de signaux issus d'origines variées agissant sur le cortex.

9.6 La polarité cellulaire apparaît dans la blastula d'amphibien et dans la morula de souris

L'émergence de la polarité dans les cellules embryonnaires est un événement important au cours du développement. Dans certains cas, cette polarisation permet une répartition différentielle de déterminants cytoplasmiques après division et est à l'origine de l'établissement de la destinée cellulaire. La **polarité apico-basale** est une polarité courante dans les épithéliums : elle décrit les différences entre les deux faces des cellules épithéliales.

Lors du clivage de l'œuf d'oursin, sa surface qui est recouverte de microvillosités, des expansions non motiles soutenues par de l'actine, devient la surface externe de la blastula. Les blastomères sécrètent du côté de cette face externe une matrice extracellulaire fine à laquelle ils adhèrent, la couche hyaline, qui contient comme protéines Fig. 9.9 Le rôle des asters et du fuseau dans le positionnement du sillon de division. Si l'appareil mitotique d'un œuf d'oursin fécondé est déplacé lors de la première division par une bille de verre, le sillon de division ne se met en place que du côté où se trouve l'appareil mitotique. Lors de la division suivante, des sillons se mettent en place, comme prévu, là où des fuseaux mitotiques sont présents (pour simplifier, un seul chromosome par fuseau est représenté), mais un sillon additionnel, indiqué par un triangle bleu, apparaît en absence de chromosomes entre deux asters appartenant à des fuseaux différents. Ce résultat a été initialement interprété comme l'indication d'un rôle des asters dans la genèse du sillon de division, indépendamment des fuseaux. Mais les microtubules issus de chacun de ces asters interagissent à l'emplacement du sillon surnuméraire : cette « zone médiane » pourrait jouer un rôle dans la définition de la position du sillon de division.



Fig. 9.10 Blastula d'embryon d'oursin (*Lytechinus pictus*). Un épithélium simple entoure le blastocœle. Les cellules épithéliales portent des cils sur leur face externe. Barre d'échelle : 10 µm.

D'après Raff, E.C., et al. : **Experimental taphonomy shows the feasibility of fossil embryos**. PNAS 2006, **103 :** 5846-5851. Copyright 2006 National Academy of Sciences, USA.

Fig. 9.11 Compaction de l'embryon de

souris. Au stade huit cellules les cellules sont relativement lisses et des microvillosités sont distribuées uniformément à leur surface. Après compaction, les microvillosités sont confinées sur la face externe et les cellules s'aplatissent les unes contre les autres. Barre d'échelle : 10 μm.

Photographie aimablement communiquée par T. Bloom reproduite avec l'autorisation de Bloom T.L. : **The effects of phorbol ester on mouse blastomeres : a role for protein kinase C in compaction?** Development 1989, **106** : 159-171. la hyaline et l'échinonectine. Des jonctions cellule-cellule se mettent en place entre blastomères, créant ainsi un épithélium. Une polarité cellulaire apico-basale se met en place dans les cellules, avec l'appareil de Golgi orienté vers leur pôle apical qui correspond à la surface de la blastula. Les jonctions cellule-cellule impliquées sont des jonctions adhérentes fondées sur des cadhérines et des **jonctions septées**, un type de jonction absent chez les chordés. Ces jonctions septées, comme les **jonctions serrées** des vertébrés, forment une barrière de perméabilité, scellant les cellules de l'épithélium et empêchant même l'eau, les petites molécules et les ions de passer librement entre les cellules. Les cellules épithéliales contrôlent ainsi ce qui entre ou sort de la blastula en passant forcément à travers leurs membranes. Sur la face interne de l'épithélium (la face basale des cellules), se met en place une lame basale (couche organisée de matrice extracellulaire). Au cours du développement de la blastula, des cils apparaissent sur sa face externe (Fig. 9.10).

Le premier indice d'une différenciation structurale dans l'embryon de souris s'observe au stade 8 cellules, lorsque la morula subit le processus de compaction (Fig. 9.11). Auparavant, les cellules se divisent de façon égale, sans orientation préférentielle, et les blastomères constituent un ensemble cellulaire sphérique lâche, dans lequel chaque cellule est couverte de façon uniforme par des microvillosités. Lors de la compaction, les blastomères s'aplatissent les uns contre les autres, les contacts cellule-cellule sont optimisés et les cellules se polarisent : les faces latérales sont définies par la présence de jonctions adhérentes à E-cadhérines et seule la face apicale présente des microvillosités (Fig. 9.12). Lors de la division suivante, chaque cellule se divise selon l'un de deux plans possibles. Les divisions radiaires donnent deux cellules polarisées mais certaines divisions sont tangentielles (parallèles à la surface), et donnent une cellule externe polarisée et une cellule interne non polarisée. Ces deux types de cellules n'ont pas les mêmes destinées. Les cellules internes forment la masse cellulaire interne, expriment les marqueurs de pluripotentialité Nanog et Oct4 (voir Chapitre 8) et donneront l'embryon et la vésicule vitelline. Les cellules externes mettent en place des jonctions serrées et adhérentes (Fig. 9.13), expriment un jeu de gènes différent, par exemple Cdx2, et forment le trophectoderme, l'épithélium externe du blastocyste à l'origine du placenta (voir Fig. 5.6).

La formation des jonctions adhérentes est un point clé de la compaction. Aux stades deux et quatre cellules, la E-cadhérine est distribuée de façon uniforme à la surface des blastomères et les contacts entre cellules ne sont pas importants. Au stade huit cellules, la localisation de la E-cadhérine est restreinte aux régions de contact intercellulaire où se forment de véritables jonctions adhérentes : les propriétés adhésives de la E-cadhérine se manifestent car le lien avec le cytosquelette du cortex cellulaire s'est établi *via* la β -caténine (voir Encart 9A). La formation de l'épithélium externe est essentielle pour la suite du développement ; elle ne s'effectue pas chez des mutants E-cadhérine et l'embryon prend la forme d'une masse désorganisée de cellules, avec des ratios anormaux de cellules exprimant *Oct4* (future masse cellulaire interne) ou *Cdx2* (futur trophectoderme) (Fig. 9.14).

La compaction s'accompagne d'un remaniement profond du cortex cellulaire. Les microvillosités disparaissent dans les régions de contact intercellulaire ; l'actine, la




Fig. 9.12 Polarisation des cellules au cours du clivage de l'embryon de souris. Au stade huit cellules, la mise en place de nombreux contacts cellulaires permet la compaction (Figure du haut). Les cellules se polarisent. Par exemple, les microvillosités, initialement distribuées uniformément sur la surface cellulaire, sont confinées à la face constituant la surface de la morula. Les divisions suivantes génèrent soit deux cellules polarisées (par division radiaire, en bas à gauche), soit une cellule polarisée et une cellule non polarisée (par division tangentielle, en bas à droite). Les divisions tangentielles donnent naissance à la masse cellulaire interne

myosine et une autre protéine associée au cytosquelette, la spectrine, sont éliminées de ces zones et se concentrent dans une bande ceinturant la face apicale de la cellule polarisée. Inversement, les E-cadhérines se localisent sur les faces latérales de ces cellules.

9.7 Les jonctions serrées et un transport d'ions permettent une accumulation de liquide à l'origine de la formation du blastocœle dans le blastocyste de mammifère

L'accumulation de liquide dans l'espace interne, le blastocœle, d'un blastocyste ou d'une blastula exerce une pression centrifuge sur la paroi. Cette pression hydrostatique est l'une des forces responsables de la forme sphérique. Chez les mammifères, le blastocœle se forme avant l'implantation du blastocyste par un processus de cavitation lié à une accumulation de liquide à l'intérieur de ce dernier. L'influx d'eau est provoqué par un transport actif d'ions sodium et d'autres électrolytes dans les espaces extracellulaires (Fig. 9.15)

Au stade huit cellules, les jonctions serrées se mettent en place entre les cellules polarisées de la couche cellulaire externe de la morula. Au stade 32 cellules, cette barrière est totalement mise en place. Par ailleurs, les pompes à sodium Na⁺/ K⁺-ATPase et d'autres protéines de transport membranaire deviennent actives dans les membranes basolatérales des cellules : elles transportent le sodium et les autres électrolytes dans l'espace extracellulaire, qui est en continuité avec le blastocœle. L'augmentation de la concentration ionique du blastocœle provoque par osmose une sortie d'eau facilitée par la présence d'aquaporines dans les membranes cellulaires. L'augmentation de pression hydrostatique qui en résulte étire l'épithélium limitant la cavité. Un mécanisme similaire, fondé sur un transport ionique, semble aussi à l'origine du remplissage du blastocœle de la blastula de xénope, chez lequel un petit blastocœle est observable en microscopie électronique dès le stade deux cellules.

Fig. 9.13 La structure d'une jonction serrée. Les membranes apposées de deux cellules épithéliales adjacentes sont intimement maintenues par la jonction serrée localisée sous la face apicale de la cellule et qui forme un joint hermétique empêchant l'eau, les petites molécules et les ions de passer librement entre les cellules. Les membranes sont ancrées par des rangées continues de protéines membranaires (occludines et claudines), qui s'accrochent fermement entre elles. La zone rose représente l'extérieur de l'épithélium, la zone jaune montre les espaces intercellulaires au sein de l'épithélium.

D'après Alberts, B., et al. : Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition, Garland Science, New York. 2008.





Fig. 9.14 Des embryons de souris mutante pour la E-cadhérine ne subissent pas la compaction et ne forment pas de blastocyste. À gauche, un blastocyste normal : la masse cellulaire interne (en vert, cellules exprimant Otx4) surmonte un espace rempli d'un liquide limité par le trophectoderme (en rouge, cellules exprimant Cdx2). À droite : masse désorganisée de cellules issue du clivage d'un zygote mutant dépourvu de E-cadhérine. La plupart des cellules expriment le marqueur trophectodermique Cdx2, quelques cellules expriment Oct4. Barres d'échelle : 20 µm.

D'après Stephenson, R. O. et al. : Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. Development 2010, **137** : 3383-3391.

Fig. 9.15 Le blastocœle du blastocyste de mammifère est formé grâce à un influx d'eau, créant une cavité interne remplie de liquide. Schéma à gauche : le transport actif d'ions sodium (Na+) vers l'espace extracellulaire, qui est en continuité avec le blastocœle du blastocyste de souris, s'effectue, à travers les membranes basolatérales des cellules du trophectoderme (flèche jaune) et génère une augmentation de la concentration ionique dans cet espace, provoquant une sortie d'eau depuis le cytoplasme par osmose. Le sodium des cellules du trophectoderme est remplacé par du sodium entrant par diffusion depuis le liquide isotonique qui entoure le blastocyste (flèche blanche), l'eau suivant par osmose. Le blastocœle est hermétiquement isolé de l'extérieur par des jonctions serrées entre les cellules du trophectoderme. En augmentant la pression hydrostatique interne, l'influx d'eau augmente le volume du blastocœle. À droite : surface d'un blastocyste de souris montrant les jonctions étanches entre les cellules épithéliales.

D'après Eckert, J.J., and Fleming, T.P. : Tight junction biogenesis during early development. Biochim. Biophys. Acta 2008, 1778 : 717-728.

RÉSUMÉ

Chez de nombreux animaux, l'œuf fécondé subit un clivage qui le divise en un certain nombre de blastomères et donne finalement une blastula creuse. Il existe différentes modalités de clivage chez les différents groupes d'espèces animales. Chez certains, comme les nématodes ou les mollusques, la position des plans de division détermine la position de blastomères particuliers dans l'embryon, et la distribution de déterminants cytoplasmiques. Le plan de division des cellules animales dépend de l'orientation du fuseau mitotique, elle-même déterminée par la position finale des asters. À la fin du clivage, la blastula est formée d'un épithélium polarisé entourant un blastocœle rempli de liquide. L'accumulation de ce fluide dans le blastocœle est partiellement due à un transport actif d'ions dans le blastocœle, qui entraîne un mouvement d'eau par osmose.





Les mouvements de la gastrulation

Les mouvements de cellules individuelles et de feuillets cellulaires pendant la gastrulation permettent, à partir de la blastula (ou du stade équivalent), la mise en place de la plupart des tissus dans leur position définitive selon le plan d'organisation de l'espèce. L'importance des mouvements de la gastrulation est illustrée par la carte des territoires présomptifs de la blastula, par exemple chez les oursins ou les amphibiens, qui montre que l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme présomptifs sont initialement des régions adjacentes dans la couche cellulaire continue formant la surface de la blastula sphérique, et des mouvements font ensuite pénétrer l'endoderme et le mésoderme à l'intérieur de l'embryon (voir Chapitres 4, 5 et 6). Après la gastrulation, les positions relatives de ces tissus sont très modifiées. Par exemple, l'endoderme donne un tube digestif interne, et est séparé de l'ectoderme externe par une couche de mésoderme.

La gastrulation implique donc des modifications importantes de la structure générale de l'embryon, qui acquiert une structure tridimensionnelle complexe. Au cours de la gastrulation, un programme d'activité cellulaire remodèle l'embryon de telle façon que l'endoderme et le mésoderme sont internalisés et que seul l'ectoderme reste en surface. Les modifications de morphologie cellulaire et la capacité des cellules à migrer (voir Encart 9B) sont, pour l'essentiel, à l'origine des forces impliquées dans la gastrulation. Dans certains embryons, toutes ces modifications se font avec très peu ou sans augmentation du nombre ou de la masse totale des cellules.

Dans cette partie du chapitre, seront considérés les exemples relativement simples de la gastrulation chez les oursins et les insectes. Le xénope sera le principal modèle pour l'étude de la gastrulation plus complexe des vertébrés. Même si le plan d'organisation final est similaire, la gastrulation du poulet et de la souris est assez différente de celle du xénope, car la morphologie des embryons précoces n'est pas la même. Pour terminer cette partie du chapitre, les types de mouvements impliqués dans la gastrulation du poulet et de la souris seront brièvement comparés avec ceux du xénope.

9.8 La gastrulation chez l'oursin implique une transition épithéliomésenchymateuse, des migrations cellulaires et une invagination de la paroi de la blastula

Avant la gastrulation, la blastula d'oursin est formée d'un épithélium simple cilié entourant un blastocœle rempli de liquide. Le futur mésoderme occupe le pôle végétatif, avec pour voisin le futur endoderme (Fig. 9.16). Le reste de l'embryon donnera l'ectoderme. L'épithélium présente une polarité apico-basale : sur sa face apicale externe se trouve la couche hyaline et sa face basale, côté blastocœle, repose sur une lame basale. Les cellules épithéliales sont jointes latéralement par des jonctions septées et adhérentes. La gastrulation implique des mouvements et des comportements cellulaires qui exploitent les propriétés d'adhésivité et de motilité discutées dans les sections précédentes.

La gastrulation débute par une transition épithélio-mésenchymateuse au cours de laquelle les cellules mésodermiques les plus végétatives quittent l'épithélium de la blastula pour devenir des cellules mésenchymateuses mobiles (Fig. 9.17). Elles se détachent de leurs voisines et de la couche hyaline en migrant vers l'intérieur du blastocœle sous forme de cellules isolées qui ont perdu leur polarité apico-basale et leur morphologie cubique. L'ensemble de ces cellules forme le **mésenchyme primaire** (voir Section 6.9). La transition et le déplacement de ces cellules sont précédés par une intense activité pulsatile de leur pôle basal et parfois une invagination transitoire de la surface de la blastula est observée avant que la migration ne commence réellement. L'internalisation cellulaire nécessite la disparition de l'adhérence entre cellules. Elle est associée à la répression de l'expression des cadhérines, l'élimination des cadhérines de la surface cellulaire par endocytose et la disparition des caténines α et β qui lient les cadhérines au cytosquelette (voir Encart 9A).

La transition épithélio-mésenchymateuse est régulée en partie par l'homologue chez l'oursin du gène *snail*, initialement identifié chez la drosophile (voir Section 2.16), qui



Fig. 9.16 La blastula d'oursin avant gastrulation. L'endoderme (en jaune) et le mésoderme (en orange) présomptifs sont localisés au pôle végétatif. Le reste de la blastula est constitué d'ectoderme présomptif (en gris). L'embryon est entouré d'une couche hyaline extracellulaire et une lame basale recouvre la surface interne du blastocœle. La surface de la blastula porte de nombreux cils.



Fig. 9.17 La gastrulation chez l'oursin. Des cellules à devenir mésodermique du pôle végétatif subissent une transition et deviennent les cellules du mésenchyme primaire qui pénètrent dans le blastocœle. L'endoderme s'invagine ensuite et progresse dans le blastocœle vers le pôle animal, formant le tube digestif embryonnaire, l'archentéron. Des filopodes issus des cellules situées au sommet de l'invagination et à l'origine du mésenchyme secondaire, entrent en contact avec la paroi du blastocœle puis dirigent l'extrémité aveugle de l'archentéron vers le site de la future bouche, avec lequel elle fusionne, formant ainsi le tube digestif. Barre d'échelle : 50 um.

Photographies aimablement communiquées par J. Morrill.

Fig. 9.18 Migration du mésenchyme primaire au cours du développement précoce de l'oursin. Les cellules du mésenchyme primaire pénètrent dans le blastocœle au niveau du pôle végétatif et migrent le long de la paroi du blastocœle par l'extension et la contraction de filopodes. En quelques heures, elles s'organisent en un anneau dans la zone végétative avec des extensions ventrales. code, comme beaucoup d'autres gènes du développement, un facteur de transcription. Des expériences utilisant des morpholinos anti-sens (voir Encart 6B) pour éteindre l'expression de *snail* dans l'embryon d'oursin précoce, ont montré que ce gène est nécessaire à la répression du gène de la cadhérine et à l'endocytose de celle-ci au cours du processus de transition. Le rôle de la famille des facteurs de transcription Snail dans ce type de modification cellulaire est très conservé dans le monde animal. Les médecins s'intéressent de près aux actions de Snail et de Slug, un facteur proche. En effet, des cellules cancéreuses passent, de façon analogue, par une transition épithélio-mésenchymateuse pour quitter le site originel d'une tumeur, avant de se déplacer vers un autre site du corps et de provoquer l'apparition de **métastases**. Dans ces cellules, les expressions de *snail* et de *slug* dépassent largement leur faible expression observée dans des cellules normales.

Après leur internalisation, les cellules du mésenchyme primaire de l'oursin migrent dans le blastocœle et s'organisent sur la face interne de la paroi de celui-ci. Elles forment tout d'abord un anneau situé autour de l'archentéron dans la région végétative, à la limite ectoderme – endoderme, puis certaines cellules migrent et forment deux extensions vers le pôle animal du côté ventral (oral) (Fig. 9.18). Le trajet migratoire de chacune de ces cellules varie considérablement d'un embryon à l'autre mais la disposition finale de l'ensemble est assez constante. Par leur sécrétion de protéines matricielles, ces cellules seront ensuite à l'origine des spicules de l'endosquelette de la larve (voir Section 6.15).





Les cellules du mésenchyme primaire se déplacent sur la surface interne de la paroi du blastocœle grâce à des filopodes, qui peuvent atteindre 40 µm de long et s'étendre dans des directions variées. Ces filopodes contiennent des faisceaux de filaments d'actine et l'assemblage rapide des filaments permet l'allongement du filopode en poussant son extrémité (voir Encart 9B). À tout moment, une cellule possède en moyenne six filopodes, dont la plupart sont branchés. Lorsqu'un filopode établi un contact et adhère à la lame basale tapissant le blastocœle, il se rétracte, tirant le corps cellulaire vers le point de contact. Comme chaque cellule émet plusieurs filopodes (Fig. 9.19) dont certains (ou tous) peuvent se rétracter, il semble exister une compétition entre les filopodes. La cellule est finalement tirée vers la région où les contacts sont les plus stables. Le mouvement des cellules du mésenchyme primaire ressemble donc à une recherche aléatoire des points d'attachements les plus stables. Au cours de la migration, les filopodes des cellules peuvent fusionner, formant des extensions en forme de câble.

Si des cellules du mésenchyme primaire sont injectées artificiellement au pôle animal, elles se déplacent vers leur position normale dans la région végétative, ce qui suggère l'existence de signaux de guidage, probablement sous forme de gradient, dans la lame basale. Cette expérience d'injection, réalisée avec des cellules qui ont déjà migré, donne le même résultat. L'un des facteurs orientant la migration est la stabilité des contacts entre filopodes et paroi du blastocœle. L'analyse de films de ces migrations cellulaires suggère que les contacts les plus stables sont établis dans les régions où les cellules finissent par s'accumuler, c'est-à-dire l'anneau autour du pôle végétatif et les deux amas ventro-latéraux (voir Fig. 9.18).

Les molécules de signalisation FGF-A (pour *Fibroblast Growth Factor-A*) et VEGF (pour *Vascular Epithelial Growth Factor*) pourraient jouer un rôle de guidage. Dans la blastula, le FGF-A est exprimé dans les régions ectodermiques vers lesquelles le mésenchyme primaire migre et le récepteur au FGF-A est exprimé par les cellules migrantes. Si la signalisation FGF-A est inhibée, la migration cellulaire et la formation du squelette le sont aussi. Le VEGF est exprimé par les cellules migrent, et le récepteur au VEGF est exprimé exclusivement par les cellules migrent, et le récepteur au VEGF est exprimé exclusivement par les cellules du futur mésenchyme primaire. Comme pour le FGF, si le VEGF ou son récepteur sont absents, les cellules n'atteignent pas leurs positions normales et le squelette ne se forme pas.

L'internalisation du mésenchyme primaire est suivie de l'invagination et de l'extension de l'endoderme, qui forme l'intestin embryonnaire ou archentéron. L'endoderme s'invagine sous forme d'un feuillet cellulaire continu (voir Fig. 9.17) et édifie l'archentéron en deux temps. L'invagination de l'endoderme forme d'abord un cylindre court et trapu qui pénètre sur la moitié du blastocœle. Après une courte pause, l'extension se poursuit : pendant cette deuxième phase, les cellules situées au sommet de l'invagination, qui se détacheront plus tard pour former le mésenchyme secondaire, émettent de longs filopodes qui entrent en contact avec la paroi du blastocœle. La contraction de ces filopodes tire alors l'archentéron jusqu'à ce qu'il entre en contact et fusionne avec la région qui sera celle de la bouche, et qui forme une petite invagination sur la face ventrale de l'embryon (voir Fig. 9.17). Au cours de ce processus, le nombre de cellules de l'archentéron double, en partie grâce à des cellules situées autour du site d'invagination, qui contribuent à la construction de l'intestin postérieur.

Comment le processus d'invagination est-il déclenché ? L'explication la plus simple est qu'une modification de la forme des cellules endodermiques provoque, et maintient, le changement de courbure du feuillet cellulaire (Fig. 9.20). Au site d'invagination, les cellules initialement cubiques prennent une forme trapézoïdale, allongée et plus fine du côté externe (apical). Cette modification, résultat d'une contraction de l'actomyosine corticale au niveau de l'apex cellulaire (voir Encart 9B), est suffisante pour provoquer la déformation vers l'intérieur de la surface du feuillet cellulaire et maintenir l'invagination. La simulation par ordinateur d'une constriction apicale s'étendant progressivement sur le pôle végétatif en produisant une invagination, conforte cette hypothèse (Fig. 9.21).

L'invagination initiale ne permet à l'archentéron de parcourir qu'un tiers de son trajet final. La seconde phase de l'invagination implique deux mécanismes différents : la contraction des filopodes en contact avec la future région buccale et un processus



Fig. 9.19 Filopodes de cellules mésenchymateuses d'oursin. Cette micrographie en microscopie électronique à balayage montre un groupe de cellules du mésenchyme primaire se déplaçant sur la paroi du blastocœle grâce à leurs nombreux filopodes, qui peuvent s'étendre et se contracter. La photo montre que des filopodes de cellules voisines peuvent fusionner.

Photographie aimablement communiquée par J. Morrill, d'après Morrill, J.B., Santos, L.L. : A scanning electron micrographical overview of cellular and extracellular patterns during blastulation and gastrulation in the sea urchin, Lytechinus variegatus. In The Cellular and Molecular Biology of Invertebrate Development. Edited by Sawyer, R.H. and Showman, R.M. University of South Carolina Press, 1985; pp. 3-33.





Fig. 9.21 Simulation par ordinateur du rôle de la constriction apicale dans l'invagination. Elle suggère que l'extension progressive d'une constriction apicale sur une région d'un feuillet cellulaire peut conduire à une invagination

Illustration d'après Odell, G.M., et al. : **The** mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination. Dev. Biol. 1981, **85** : 446-462. filopode-indépendant. Les traitements qui inhibent l'attachement des filopodes à la paroi du blastocœle empêchent l'extension complète de l'archentéron, mais il atteint cependant les deux tiers de sa longueur finale. L'allongement indépendant des filopodes est dû à un réarrangement actif des cellules au sein du feuillet endodermique. Le marquage avant gastrulation d'une zone de cellules du pôle végétatif avec un marqueur fluorescent permet de suivre ces cellules : lors de l'extension de l'archentéron, elles s'organisent sous forme d'une étroite bande allongée (Fig. 9.22). Le feuillet cellulaire s'est allongé dans une direction tout en se réduisant en largeur. Ce type de réarrangement, connu sous le terme d'« extension convergente », sera évoqué plus loin en détail à propos d'un phénomène similaire observé lors de la gastrulation chez la drosophile, les amphibiens et le poisson-zèbre (voir Encart 9C).

Comment l'extrémité de l'archentéron atteint-elle la région de la future bouche ? Les contacts exploratoires des longs filopodes avec la paroi du blastocœle sont d'abord plus stables dans la zone du pôle animal, puis dans la région de la future bouche. Les filopodes qui interagissent avec cette zone restent 20 à 50 fois plus longtemps attachés que les autres. La gastrulation de l'oursin montre clairement comment des modifications de la morphologie et de l'adhésivité cellulaires peuvent, en association avec la migration cellulaire, aboutir à des modifications majeures de la forme de l'embryon.

9.9 L'invagination du mésoderme de la drosophile est provoquée par des modifications de morphologie cellulaire contrôlées par des gènes de polarité dorso-ventrale

Au début de la gastrulation, l'embryon de drosophile est un blastoderme d'environ 6 000 cellules formant une monocouche cellulaire superficielle (voir Section 2.1). La gastrulation commence par l'invagination d'une bande longitudinale, large de 9-10 cellules, de futures cellules mésodermiques sur la face ventrale de l'embryon, qui forme un sillon ventral puis un tube transitoire à l'intérieur de l'embryon. Le tube se résout en cellules individuelles, qui s'étalent pour former une couche unique de mésoderme sur la face intérieure de l'ectoderme (Fig. 9.23). Le tube digestif se met en place un peu plus tard par deux invaginations de l'endoderme présomptif à proximité des extrémités antérieure et postérieure de l'embryon (voir Fig. 2.3).

L'invagination du mésoderme se fait en deux temps. Tout d'abord, la face apicale des cellules de la bande centrale s'aplanit et sa surface se réduit. Les noyaux de ces cellules migrent vers la face basale. Ces modifications de morphologie cellulaire provoquent la formation du sillon et son repliement vers l'intérieur de l'embryon sous forme d'un tube, les cellules médianes constituant le tube lui-même et les cellules périphériques un « lien d'arrimage » (voir Fig. 9.23, photo centrale droite). Cette première phase dure environ 30 minutes. Pendant la seconde phase (environ une heure), les cellules formant le tube s'individualisent, prolifèrent et s'étendent latéralement. L'entrée des cellules en division est retardée pendant l'invagination et ce délai est essentiel pour permettre la modification de morphologie.

Des embryons mutants dorsalisés ou ventralisés (voir Section 2.12) montrent que ce comportement des cellules mésodermiques est autonome, comme chez l'oursin (voir Section 9.8), et ne dépend pas des tissus adjacents. Dans des embryons dorsalisés, qui n'ont pas de mésoderme, aucune cellule ne montre de constriction apicale ou de migration du noyau. Dans des embryons ventralisés, dans lesquels la majorité des cellules sont mésodermiques, ces modifications se produisent tout au long de l'axe dorso-ventral

La gastrulation chez la drosophile illustre le lien direct entre l'action de gènes de l'organisation corporelle et la morphogenèse puisque ces gènes sont à l'origine des





modifications de la morphologie et de l'adhésivité cellulaires. Chez la drosophile, les facteurs de transcription codés par les gènes *twist* et *snail* sont présents dans le futur mésoderme avant la gastrulation et participent à la mise en place de la polarité dorso-ventrale (voir Section 2.19). Mais des mutations de ces gènes perturbent l'invagination du mésoderme et leur implication dans la transition épithélio-mésenchymateuse a été aussi démontrée.

Lorsque les contours des cellules ventrales sont visualisés par un marquage des membranes cellulaires avec une protéine couplée à la GFP, la constriction apicale des cellules mésodermiques peut être directement observée. Le marquage de l'actine et de la myosine a montré que cette constriction est provoquée par une série de contractions successives d'un réseau d'actomyosine qui se met en place sous la face apicale des cellules. Ce réseau est absent chez un mutant perte de fonction *snail*. Chez un mutant *twist*, les contractions sont présentes mais elles ne provoquent pas de constriction apicale. D'autres expériences ont prouvé que Snail est nécessaire à la mise en place du processus, alors que Twist permet de stabiliser l'état de constriction entre les contractions. En absence de Twist fonctionnel, la surface cellulaire revient à son état initial après chaque contraction.

Twist et Snail contrôlent également le stade suivant de l'internalisation du mésoderme. Lorsque la partie médiane du mésoderme est internalisée, ses cellules entrent en contact avec l'ectoderme. Les jonctions adhérentes qui existaient dans le blastoderme sont éliminées (c'est l'une des conséquences de l'activité de Snail) et le mésoderme entre en transition épithélio-mésenchymateuse. Il se dissocie en cellules individuelles qui s'étalent en une monocouche couvrant la face interne de l'ecto-derme. Comme chez l'oursin, ce mouvement nécessite la présence de récepteurs au FGF sur les cellules mésodermiques et la mise en place de signalisation FGF par l'ecto-derme. Une inhibition de l'activation de la voie de signalisation. L'expression du récepteur au FGF par les cellules mésodermiques est induite par Twist et Snail. Par ailleurs, Snail réprime l'expression du FGF dans ces cellules, restreignant ainsi la production de FGF au seul ectoderme.

Snail et Twist provoquent aussi une modification de l'expression des cadhérines : les cellules mésodermiques cessent d'exprimer la E-cadhérine ectodermique pour la remplacer par la N-cadhérine. Ainsi, les cellules mésodermiques n'adhèrent plus aux cellules ectodermiques. Snail supprime la production de la E-cadhérine mésodermique tandis que Twist induit celle de la N-cadhérine. Fig. 9.22 Extension de l'archentéron au cours de la gastrulation. Le marquage de cellules du pôle végétatif de la blastula (en vert clair) montre que l'allongement de l'archentéron implique des réarrangements cellulaires au sein de l'endoderme. Les cellules marquées se distribuent selon une bande étroite.

Fig. 9.23 Gastrulation de la drosophile. La coupe transversale (à gauche) d'un embryon de drosophile à un stade précoce de la gastrulation montre la constriction apicale des futures cellules mésodermiques révélées par les taux élevés en myosine II (en rouge) et β -caténine (en vert). Les noyaux sont colorés en bleu. Les trois autres images montrent l'internalisation du mésoderme. Les cellules mésodermiques (en brun) forment une bande longitudinale dans l'épithélium du côté ventral de l'embryon. Leur passage d'une forme cubique à une forme trapézoïdale crée une invagination qui se développe en un sillon ventral (images de gauche). L'accentuation de cette modification aboutit à la formation d'un tube (image centrale droite). Les cellules mésodermigues commencent alors à migrer individuellement

Photographies reproduites avec l'autorisation de Francois Schweisguth et d'après Leptin, M., et al. : **Mechanisms of early Drosophila mesoderm formation**. Development Suppl. 1992, 23-31. Published by permission of The Company of Biologists Ltd.

vers différents sites (image de droite). Barre

d'échelle : 50 µm.





Film montrant l'extension de la bandelette germinative

9.10 L'extension de la bandelette germinative de drosophile implique un remodelage myosine-dépendant des jonctions cellulaires et une intercalation cellulaire

L'extension de la bandelette germinative, qui permet presque un doublement de la longueur du thorax et de l'abdomen, est un autre remaniement morphologique majeur de la gastrulation chez la drosophile (voir Fig. 2.4). La bandelette germinative comporte le mésoderme, l'ectoderme ventral et l'épiderme dorsal mais pas l'amnioséreuse. Son extension n'est pas due à des divisions ou des modifications morphologiques cellulaires. Elle est le résultat d'une extension convergente de la partie ventrale des feuillets épithéliaux : des cellules adjacentes s'intercalent entre elles en convergeant vers la ligne médiane, ce qui entraîne un rétrécissement en largeur de l'ensemble de l'épithélium ventral et son extension dans la direction antéro-postérieure. Ce remodelage est provoqué par des modifications régulées des jonctions adhérentes qui maintiennent normalement jointives les cellules entre elles.

Au début de l'extension de la bandelette germinative, les cellules épidermiques forment un pavement hexagonal régulier, leurs limites sont perpendiculaires à, ou à 60° de, l'axe antéro-postérieur (voir Fig. 9.24). Lorsque l'extension commence, les jonctions adhérentes des faces perpendiculaires à l'axe antéro-postérieur disparaissent et les cellules deviennent losangiques. De nouvelles jonctions se mettent en place parallèlement à l'axe antéro-postérieur : les cellules redeviennent hexagonales en s'intercalant selon l'axe médio-latéral (convergence), ce qui allonge le tissu dans le sens antéro-postérieur (extension).

La capacité à réaliser une extension convergente selon l'axe antéro-postérieur reflète une organisation préexistante des cellules qui leur confère une polarité selon cet axe au sein du feuillet épidermique. Cette polarité est soulignée par la distribution de certaines protéines de surface, mises en place en fonction de l'axe « antéro-postérieur » de la cellule, formant des bandes parallèles dans le tissu lorsqu'elles sont visualisées. La détermination de cet axe au niveau cellulaire n'est pas connue. Ce type de polarité, qui peut refléter d'autres axes que l'axe antéro-postérieur, est appelé **polarité cellulaire planaire** car les cellules sont polarisées dans le plan du tissu. Elle



Fig. 9.24 Un remodelage des jonctions permet l'intercalation des cellules lors de l'extension de la bandelette germinative de drosophile. La désorganisation et le réassemblage des jonctions intercellulaires au sein de l'épithélium permettent l'allongement du tissu selon un axe antéropostérieur et son rétrécissement en largeur. À gauche : modification des contacts entre quatre cellules au cours de l'intercalation. À droite : schéma montrant l'allongement selon l'axe antéro-postérieur (double flèche verte) dû à l'intercalation.

D'après Bertet, C., et al. : **Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation**. Nature 2004, **429** : 667-671. **Fig. 9.25** Mouvements tissulaires pendant la gastrulation du xénope. La blastula âgée est constituée d'un feuillet continu de cellules entourant le blastocœle. Le futur mésoderme (en rouge) est dans la zone marginale, recouvert par le futur endoderme (en jaune). Le futur ectoderme est en bleu. La gastrulation commence avec la formation de cellules en bouteille dans la région du blastopore, suivie de l'involution du mésoderme au niveau de la lèvre dorsale du blastopore. C'est à ce niveau, que l'endoderme de la zone marginale et le mésoderme pénètrent à l'intérieur de l'embryon. L'endoderme de la zone marginale, initialement à la surface de la blastula, se retrouve en position ventrale par rapport au mésoderme et forme le toit de l'archentéron (futur tube digestif). En même temps, l'ectoderme de la calotte animale s'étale vers le pôle végétatif par épibolie. Le mésoderme subit une extension convergente le long de l'axe antéro-postérieur. La zone d'involution progresse ventralement et finit par former un cercle autour du bouchon vitellin constitué par des cellules endodermiques encore visibles de l'extérieur.

Illustration d'après Balinsky, B.I. : An Introduction to Embryology, 4th edition. Philadelphia, W.B. Saunders, 1975.

s'observe dans de nombreux épithéliums ou mésenchymes organisés de l'embryon. Elle est différente de la polarité apico-basale des épithéliums décrite précédemment (voir Section 9.6), et a été déjà observée dans la détermination de la direction dans laquelle les « poils » se mettent en place dans l'épiderme adulte de drosophile (voir Encart 2I, qui décrit quelques-unes des protéines impliquées dans la détermination de la polarité cellulaire planaire dans ce cas). Dans la section suivante et dans l'Encart 9C, sera considérée l'importance de la polarité cellulaire planaire pour l'extension corporelle des vertébrés.

Dans la bandelette germinative, l'intercalation implique une régulation de la localisation et de l'activité de la myosine, qui co-localise avec les complexes actine/ β -caténine/E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes et qui est plus présente dans les jonctions en cours de disparition. Le mécanisme proposé est que la contraction régulée de la myosine empêche la E-cadhérine de maintenir les cellules jointives, permettant ainsi l'établissement de nouveaux contacts.

9.11 La gastrulation des amphibiens et des poissons implique involution, épibolie et extension convergente

Chez les vertébrés, la gastrulation qui implique des réarrangements profonds des tissus, aboutit à un plan d'organisation plus complexe que chez l'oursin. La présence abondante de vitellus complique encore le phénomène chez les amphibiens, les poissons et les oiseaux. Cependant, le résultat est similaire : la transformation d'un feuillet bidimensionnel de cellules en un embryon tridimensionnel, comportant un ectoderme, un mésoderme et un endoderme positionnés correctement pour le développement futur des structures corporelles. Chez les amphibiens et les poissons, les principaux mouvements de la gastrulation sont l'involution, qui correspond à l'enroulement d'un feuillet cohérent d'endoderme et de mésoderme au niveau du blastopore, comme chez le xénope (Fig. 9.25) ; l'épibolie, qui décrit l'étalement et l'amincissement du feuillet ectodermique accompagnant l'involution de l'endoderme et du mésoderme, et qui peut s'observer chez la grenouille et le poisson-zèbre ; et l'extension convergente qui allonge l'axe du corps. Un exemple d'extension convergente a été évoqué avec l'intercalation qui allonge la bandelette germinative de drosophile (voir Section 9.10).

Pour réaliser une extension convergente, les cellules doivent avoir acquis une polarité cellulaire planaire, c'est-à-dire une polarité dans le plan du tissu. Elle se traduit par des différences moléculaires ou structurales entre faces cellulaires, par exemple la formation de filopodes ou lamellipodes, la distribution du cytosquelette, ou la localisation de récepteurs de surface. La polarité planaire est quasi universelle dans les épithéliums embryonnaires et existe aussi dans certains mésenchymes. La polarité des épithéliums est facilement visible sur des structures de surface comme les cils, qui battent tous dans le même sens (voir Fig. 9.10), ce qui suppose une organisation polarisée du cytosquelette et des autres organites. En général, toutes les cellules d'un épithélium, ou d'une région d'un épithélium ont la même polarité et donnent ainsi à l'épithélium une organisation vectorielle qui peut influencer son développement.



Fig. 9.26 Formation du blastopore et gastrulation chez le xénope. Cette figure détaille les mouvements tissulaires au niveau du blastopore lors de la gastrulation d'un embryon de xénope (voir les trois premiers schémas de la Fig. 9.25). À gauche : avant gastrulation, l'endoderme présomptif (en jaune) recouvre le mésoderme présomptif (en rouge) dans la zone marginale. Au centre gauche : des cellules en bouteille subissent une constriction apicale et une élongation. Elles provoquent une involution des cellules qui les entourent et la formation d'un sillon définissant la lèvre dorsale du blastopore. Au centre droit : la gastrulation continue par l'involution de l'endoderme présomptif et du mésoderme, qui se déplace sous l'ectoderme (en bleu) vers la région antérieure. À droite : l'archentéron (futur tube digestif délimité par l'endoderme) commence à se former ; le mésoderme converge et s'allonge suivant l'axe antéro-postérieur. L'ectoderme continue à couvrir tout l'embryon par épibolie.

D'après Hardin, J.D. and Keller, R. : **The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of Xenopus laevis**. Development 1988, **103** : 211-230.



Dans ce chapitre, le rôle de la polarité cellulaire planaire sera examiné dans l'extension de la chorde, la neurulation et l'allongement de l'axe du corps. Son implication dans la croissance des bourgeons de membres sera abordée au Chapitre 11. La polarité planaire donne à la cellule des informations sur son alignement par rapport aux axes d'orientation de l'organisme et permet la bonne réalisation des mouvements cellulaires. L'extension convergente et la polarité cellulaire planaire sont étudiées plus en détail dans l'Encart 9C.

Dans une blastula tardive de xénope, l'endoderme présomptif occupe le pôle végétatif et recouvre le mésoderme présomptif. Pendant la gastrulation, l'endoderme présomptif s'invagine au niveau du blastopore pour former l'archentéron. Les cellules issues de la bande équatoriale mésodermique s'étalent sous l'ectoderme pour former une couche de mésoderme progressant vers la région antérieure, le long de la ligne médiane dorsale (Fig. 9.26).

Chez le xénope, la gastrulation commence à un endroit situé sur le côté dorsal de l'hémisphère végétatif de la blastula. Le premier signe visible est la formation, à la jonction entre l'endoderme et le mésoderme présomptifs, de cellules en bouteille résultant d'une constriction apicale (voir Encart 9B). Comme chez l'oursin et la drosophile, ces modifications de morphologie cellulaire entraînent la formation d'un sillon à la surface de la blastula. Chez le xénope, il prend la forme d'un petit sillon correspondant au blastopore, dont la lèvre dorsale est le site du centre organisateur de Spemann. Les feuillets mésodermiques et endodermiques commencent une involution au niveau du blastopore, s'enroulant vers l'intérieur contre leur propre base (voir Fig. 9.26). La zone d'involution progresse latéralement et ventralement au cours de la gastrulation et implique finalement l'ensemble de l'endoderme, le blastopore formant à la fin un cercle qui entoure un bouchon vitellin. Puis le blastopore se contracte, entraînant les cellules endodermiques vers l'intérieur où elles forment le plancher de l'archentéron.

Après leur involution, les toutes premières cellules mésodermiques migrent individuellement sur le toit du blastocœle et donneront les structures mésodermiques les plus antérieures situées dans la tête. Les cellules mésodermiques suivantes entrent, accompagnées par les cellules endodermiques, sous forme d'un feuillet constitué de plusieurs couches cellulaires. Pour ce feuillet, le passage au niveau du blastopore est comparable à celui dans un entonnoir et les cellules sont réarrangées par extension convergente, l'une des principales caractéristiques de la gastrulation.

Le mésoderme présomptif est initialement sous forme d'un anneau équatorial mais, au cours de la gastrulation, il converge et s'étend le long de l'axe antéro-postérieur (Fig. 9.27). Ainsi, des cellules de la blastula, situées initialement à l'opposé l'une de

ENCART 9C L'extension convergente

L'extension convergente est un mécanisme majeur de la gastrulation et d'autres processus morphogénétiques. Ce mécanisme permet l'allongement d'un feuillet cellulaire dans une direction accompagné d'un rétrécissement dans la direction perpendiculaire. Il implique un réarrangement des cellules au sein du feuillet, plutôt que des divisions ou des migrations cellulaires. Il est par exemple impliqué dans l'élongation de l'axe antéro-postérieur des





amphibiens (voir Fig. 9.28). Au préalable, les axes des intercalations et d'extension que suivront les cellules doivent avoir été définis. Les cellules s'allongent d'abord dans une direction perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur (la direction médio-latérale) : elles s'alignent parallèlement entre elles dans la direction perpendiculaire à l'extension tissulaire (voir Figure 1). Les mouvements actifs sont essentiellement restreints aux extrémités de ces cellules bipolaires, où des filopodes leur permettent d'exercer des tractions sur leurs voisines et sur le substrat. Ces mouvements font que les cellules s'imbriquent les unes dans les autres selon l'axe médio-latéral. Ce réarrangement est décrit sous le nom d'**intercalation médio-latérale**. Aux limites du tissu, l'une des extrémités cellulaires est immobilisée et les mouvements cessent, mais les cellules peuvent toujours exercer des tractions entre elles, ce qui rapproche les limites tissulaires.

Les frontières d'un tissu en extension convergente sont fixées par le comportement des cellules. Lorsqu'une extrémité cellulaire est située près de cette frontière, ses mouvements cessent et la cellule devient monopolaire (Figure 1). Seule son extrémité tournée vers le tissu reste active. La nature de ce qui définit cette

> frontière n'est pas connue, mais les limites entre mésoderme, ectoderme et endoderme semblent spécifiées avant le début de la gastrulation.



Figure 2



Un mécanisme similaire, l'intercalation radiaire, permet l'amincissement d'une couche multicellulaire en une couche plus fine mais plus étendue (Figure 2). Ce mécanisme est observé pendant l'épibolie de l'ectoderme au cours de la gastrulation du xénope et du poisson-zèbre (Fig. 9.30). L'intercalation radiaire concerne l'ectoderme pluristratifié de la moitié animale où des cellules s'intercalent perpendiculairement à la surface de l'embryon, en se déplaçant d'une couche interne vers une couche plus externe. L'épaisseur de l'ectoderme diminue mais sa surface augmente, ce qui est en partie à l'origine de l'épibolie.

Les mécanismes moléculaires contrôlant l'extension convergente chez les vertébrés sont apparentés à ceux qui contrôlent la polarité cellulaire planaire chez la drosophile (voir Encart 2I), et impliquent les protéines Wnts/Frizzled *via* la voie Wnt non canonique de la polarité cellulaire planaire. La version simplifiée de la Figure 3 est une compilation de données concernant différents organismes. L'activation par Wnt de son récepteur Frizzled (Fz) active, *via* Dishevelled (Dsh), RhoA et la Rho-kinase Rok2 qui induisent une modification du cytosquelette d'actine. La protéine transmembranaire Van Gogh (Vang) et d'autres protéines identifiées chez la drosophile participent également à cette voie chez les vertébrés. Vang est supposé interagir avec Dsh et stimuler l'activation de JNK (pour *Jun N-terminal Kinase*), une autre protéine kinase capable d'activer le facteur de transcription AP1.

Figure 3



Fig. 9.27 Extension convergente du mésoderme. Le mésoderme (rouge, orange et jaune) forme initialement un anneau équatorial. Pendant la gastrulation, il converge et s'étend selon l'axe antéropostérieur. A-D sont des repères utilisés pour illustrer l'ampleur du mouvement d'extension pendant la convergence-extension. Dans le schéma du bas, D est masqué par C.

Fig. 9.28 Le réarrangement du mésoderme et de l'endoderme pendant

la gastrulation du xénope. Le mésoderme présomptif (en rouge et orange) forme un anneau entourant la blastula, sous l'endoderme (en jaune) qui est représenté ici en écorché. Pendant la gastrulation, ces deux tissus s'invaginent dans l'embryon par le blastopore, modifiant leur forme en particulier par extension convergente. Les repères A et B, initialement proches, sont séparés. Les repères C et D, initialement éloignés sur la blastula deviennent très proches l'un de l'autre. Dans le neuroectoderme (en bleu), une extension convergente se produit aussi. À noter qu'au cours de ces stades, il y a très peu de divisions ou de croissance cellulaires, toutes ces modifications se produisant par des réarrangements de cellules au sein des tissus.

l'autre, peuvent finalement se retrouver très proches (Fig. 9.28), là où d'autres seront séparées le long de l'axe de l'embryon. La migration des cellules du mésoderme est orientée dans la direction du pôle animal, et dépend des interactions de ces cellules avec la fibronectine de la matrice extracellulaire présente sur le toit du blastocœle. L'assemblage de fibrilles de fibronectine dans la matrice est orienté par des tensions à la surface de l'épithélium, générées par des adhérences cellule/cellule et transmises à la matrice *via* des intégrines interagissant avec la fibronectine.

Chez le xénope, l'extension convergente concerne le mésoderme et l'endoderme lors de leur involution, et par la suite, le futur ectoderme neural qui donnera la moelle épinière. Tous ces processus, comme l'élongation de la chorde, allongent l'embryon selon son axe antéro-postérieur. Une vue d'une jeune gastrula depuis le blastopore souligne l'ampleur spectaculaire de l'extension convergente. Le futur mésoderme peut être identifié par l'expression du gène *brachyury*, visible sous forme d'un anneau autour du blastopore (Fig. 9.29). Au fur et à mesure que ce tissu pénètre dans la gastrula, il se concentre en une bande étroite située le long de la ligne médiane dorsale et s'étend selon l'axe antéro-postérieur. Finalement, l'expression de *brachyury* est restreinte au mésoderme de la chorde, situé dans l'axe médian. Une analyse génétique a montré que *brachyury* active un réseau de gènes incluant non seulement des gènes impliqués dans la détermination du mésoderme, mais aussi des gènes codant des molécules impliquées dans l'extension convergente. Il existe bien un lien entre la mise en place du plan d'organisation et le comportement des cellules au cours de la gastrulation et de l'extension de la chorde.

Au cours de la gastrulation, le mésoderme vient se positionner juste en dessous de l'ectoderme et au-dessus de l'endoderme qui forme le toit de l'archentéron (voir Fig. 9.25). Même s'ils sont en contact, le mésoderme et l'ectoderme se déplacent indépendamment l'un de l'autre. Pendant les déplacements en interne du mésoderme et de l'endoderme, l'ectoderme de la calotte animale s'étale en direction de la région végétative par épibolie jusqu'à recouvrir l'ensemble de l'embryon. L'épibolie implique un étirement des cellules situées en surface mais aussi des réarrangements cellulaires par **intercalation radiaire**, les cellules de la couche profonde ectodermique s'intercalant avec celles situées immédiatement au-dessus d'elles (voir Encart 9C). Ces deux processus provoquent un amincissement de l'ectoderme et une augmentation de sa surface.

La gastrulation chez le poisson-zèbre présente des similitudes et des différences avec celle du xénope (voir Fig. 3.11 pour une description). Elle commence par une extension du blastoderme du pôle animal vers le pôle végétatif. Comme chez le xénope, cette épibolie est permise par intercalation radiaire de cellules, ici au sein de la couche profonde située sous la couche enveloppante de cellules superficielles aplaties, et s'accompagne d'un amincissement du blastoderme (Fig. 9.30, à gauche). Au moment où le blastoderme recouvre la masse vitelline à moitié, les



cellules de la couche profonde ont formé sur le bord du blastoderme un épaississement (l'anneau germinatif) où elles se sont réparties en deux couches cellulaires sous la couche superficielle enveloppante, le futur ectoderme recouvrant l'endomésoderme. Les cellules de l'endomésoderme entament alors une involution en bordure de l'anneau germinatif et se dirigent vers la future extrémité antérieure de l'embryon (Fig. 9.30, au centre). L'ectoderme continue le mouvement d'épibolie vers le pôle végétatif. Puis se produit un phénomène d'extension convergente au sein de l'ectoderme et de l'endomésoderme avec une convergence vers la ligne médiane dorsale et une extension selon l'axe antéro-postérieur, ce qui allonge l'embryon (Fig. 9.30, à droite).

Au cours de la gastrulation des amphibiens et du poisson-zèbre, les cellules des tissus engagés dans une extension convergente vers l'axe antéro-postérieur sont polarisées dans la direction médio-latérale (voir Encart 9C). Les forces contractiles générées aux extrémités des cellules allongées sont à l'origine de la migration vers la ligne médiane et de l'extension du tissu. Des cellules en extension convergente peuvent être imaginées comme des lignes de cellules tirant les unes sur les autres dans une direction perpendiculaire au sens d'allongement ; comme les cellules bordant le tissu sont contraintes à une extrémité, ces tensions provoquent un raccourcissement et donc une extension perpendiculaire.

La figure 9.31 compare l'extension convergente impliquée dans l'allongement de la chorde chez le xénope et chez le poisson-zèbre. Dans le cas du poisson, l'allongement implique une migration initiale directe de cellules mésodermiques individuelles depuis les zones latérales vers la ligne médiane (un mouvement connu sous le nom de **convergence dorsale**), suivie d'une intercalation médio-latérale au fur et à mesure de l'incorporation de ces cellules dans la future chorde au niveau de la ligne médiane.

9.12 Le développement de la chorde chez le xénope illustre la nécessité d'une polarité antéro-postérieure pré-établie pour la mise en place d'une polarité cellulaire médio-latérale

Chez le xénope, le mésoderme présomptif de la chorde est l'un des premiers à s'internaliser au cours de la gastrulation (voir Fig. 4.27) et la chorde est la première structure axiale mise en place. Elle forme finalement une baguette dense de cellules le long de l'axe médian dorsal de l'embryon. Elle a un rôle de support structural, mais elle est aussi la source de signaux pour la mise en place des somites (voir Section 5.13). Pendant la gastrulation, le mésoderme chordal s'allonge par un processus d'intercalation médio-latérale, qui permet une extension convergente selon l'axe antéro-postérieur (Fig. 9.32). Cette intercalation ne peut se faire sans la mise en place préalable d'une polarité antéro-postérieure dans le mésoderme chordal.

Initialement, la chorde se distingue du mésoderme somitique adjacent par une compaction plus importante de ses cellules et par un petit espace séparant ces deux tissus, sans doute lié à des différences d'adhésivité. Après un allongement initial par intercalation médio-latérale et extension convergente, la chorde subit une nouvelle diminution importante de largeur et une augmentation de hauteur (Fig. 9.31). Les cellules s'allongent perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur, préfigurant un agencement en « part de pizza » des cellules (voir Fig. 9.32, en bas), puis s'intercalent avec leurs voisines en provoquant une nouvelle extension convergente. Le stade suivant de la mise en place de la chorde, qui renforce et allonge encore cette baguette de mésoderme, implique un processus de dilatation directionnelle et est décrit plus loin dans ce chapitre.

La « version vertébré » de la voie de polarisation cellulaire planaire passant par Wnt (voir Encart 9C) est nécessaire à la polarisation médio-latérale individuelle des cellules de la chorde. Si elle n'est pas fonctionnelle, les cellules ne s'allongent pas et ne développent pas de lamellipodes polarisés. Mais un autre système de polarisation est aussi impliqué dans l'extension convergente de l'axe corporel des vertébrés, qui stabilise la direction de l'extension dans cette population de cellules constamment en mouvement et en réarrangement. Le futur mésoderme chordal a pour origine l'organiseur situé au niveau de la lèvre dorsale du blastopore (Fig. 4.27) qui est lui-même régionalisé : les cellules les plus proches de la lèvre dorsale, qui formeront la partie antérieure de la chorde, s'invaginent avant les cellules qui formeront la chorde



Film montrant une extension convergente chez le poissonzèbre



Fig. 9.29 L'expression de brachyury pendant la gastrulation du xénope illustre l'extension convergente. À gauche : avant la gastrulation, l'expression de brachyury (coloration foncée) marque le futur mésoderme, présent sous forme d'un anneau équatorial dans cette vue du pôle végétatif. À droite : au cours de la gastrulation, le mésoderme qui formera la chorde (délimité par les lignes bleues) converge et s'étend le long de la ligne médiane. Barre d'échelle : 1 mm.

Photographie reproduite avec l'autorisation de Smith, J.C., et al. : **Xenopus Brachyury**. Semin. Dev. Biol. 1995, **6** : 405-410. © 1995 by permission of the publisher, Elsevier.



postérieure. Après la gastrulation, la chorde participe à l'induction de l'ectoderme neural sus-jacent en inhibant l'activité des BMP (voir Section 4.16).

Cette régionalisation antéro-postérieure du mésoderme semble être un pré-requis pour l'intercalation des cellules et l'extension convergente. Si des explants du futur mésoderme chordal « antérieur » et « postérieur » d'une jeune gastrula de xénope sont désagrégés et que les cellules sont mélangées, les cellules se reconnaissent entre elles et se séparent selon leur identité positionnelle antéro-postérieure. L'intercalation et l'extension convergente ne sont observées que dans les mélanges comportant à la fois des cellules issues des zones antérieures et postérieures ; elles sont absentes avec des mélanges de cellules de même origine. Ces expériences suggèrent que la régionalisation antéro-postérieure est nécessaire à la mise en place de la polarité planaire médio-latérale qui permet à ces cellules de s'intercaler. Le lien entre les signaux déterminant la position antéro-postérieure et ceux qui déterminent la polarité planaire cellulaire n'est pas connu actuellement.

Fig. 9.31 Extension convergente au cours de la formation de la chorde chez le xénope et

le poisson-zèbre. Les schémas de gauche montrent l'extension convergente du mésoderme lors de la formation de la chorde chez le xénope qui se réalise par une intercalation médiolatérale de cellules au sein d'un feuillet cohérent. Les schémas de droite montrent cette formation par extension convergente chez le poisson-zèbre, qui s'effectue par des mouvements dirigés au sein d'un ensemble lâche de cellules mésenchymateuses mésodermiques depuis les régions latérales vers la ligne médiane, suivis d'une insertion dans la future chorde et d'une intercalation médio-latérale à l'intérieur de ses limites

Illustration d'après Wallingford, J.B., et al. : **Convergent extension : the molecular control of polarized cell movement during embryonic development**. Dev. Cell 2002, **2**: 695-706.

Fig. 9.30 Les mouvements de la gastrulation chez le poisson-zèbre.

Schémas de gauche : le premier signe de la gastrulation chez l'embryon de poissonzèbre est l'étalement du blastoderme sur la surface de la masse vitelline. Cette épibolie est permise par un amincissement de la couche profonde dû à un processus d'intercalation radiaire. Schémas centraux : lorsque l'épibolie est d'environ 50 %, l'endomésoderme présomptif (en brun orangé et jaune) est séparé de l'ectoderme (en bleu) et l'endomésoderme s'internalise par involution (flèche rouge). L'ectoderme ne s'internalise pas et, l'épibolie se poursuivant (flèche bleue), il finira par recouvrir l'embryon. Schémas de droite : l'extension convergente de l'endomésoderme vers la ligne médiane dorsale permet l'allongement de l'embryon. Illustration d'après Montero, J.A., Heisenberg, C.P. : Gastrulation dynamics : cells move into focus. Trends Cell Biol. 2004, 14: 620-627.





d'agencement cellulaires pendant la mise en place de la chorde chez le xénope. Pendant l'extension convergente de la chorde, sa hauteur s'accroît et ses cellules s'allongent. Le bas de la figure montre l'agencement final des cellules et leur forme en « part de pizza ».

Fig. 9.32 Modifications de forme et

D'après Keller, R., et al. : **Cell intercalation** during notochord development in Xenopus laevis. J. Exp. Zool. 1989, **251 :** 134-154.

9.13 La gastrulation de l'embryon de poulet et de souris implique la délamination de cellules de l'épiblaste et leur immigration au niveau de la ligne primitive

Les événements associés à la gastrulation des amphibiens et des poissons se retrouvent chez les amniotes, oiseaux et mammifères, et l'organisation finale est remarquablement similaire dans tous les cas (voir Fig. 3.2). Mais la topologie initiale des embryons d'amniotes, très différente de celle des embryons d'amphibiens ou de poissons, impose des contraintes mécaniques et des mouvements différents.

Lors de la gastrulation des mammifères et des oiseaux, une structure particulière se met en place : la ligne primitive. À son niveau, les cellules de l'épiblaste migrent vers l'intérieur de l'embryon et sont déterminées en tant que mésoderme ou endoderme lors de leur internalisation (voir Chapitres 3 et 5). La ligne primitive peut être vue comme un analogue fonctionnel du blastopore des embryons d'amphibiens mais, comme les embryons de poulet ou de souris sont plats, les mouvements impliqués sont différents de ceux qui sont observés dans le cas de la blastula sphérique et creuse du xénope (voir Section 3.3). Au lieu de se mouvoir sous forme de feuillets continus, les cellules de l'épiblaste subissent une transition épithélio-mésenchymateuse complète et se séparent de l'épithélium épiblastique, pour former une couche cellulaire, processus nommé délamination. Les cellules se déplacent isolément vers l'intérieur au travers de la ligne primitive, un processus appelé immigration ou *ingression* (Fig. 9.33).

La ligne primitive de l'embryon de poulet se met en place à partir d'une zone de la région postérieure du blastodisque, sous forme d'une population dynamique



Fig. 9.33 La délamination et le mouvement des cellules au sein de la ligne primitive impliquent une constriction apicale et une transition épithéliomésenchymateuse. La ligne primitive est un sillon visible au niveau de l'épiblaste, créé par une constriction apicale des cellules de cette région. Les cellules deviennent trapézoidales suite à la contraction du réseau d'actine situé sous leur face apicale. Au niveau de la ligne primitive, les cellules entrent en transition épithélio-mésenchymateuse et perdent leurs jonctions, y compris les jonctions adhérentes. La lame basale est inexistante à ce niveau. Les cellules peuvent quitter l'épiblaste et migrer individuellement sous la ligne primitive (flèche rouge). Les cellules qui réalisent cette immigration formeront le mésoderme et l'endoderme. Les cellules qui restent dans l'épiblaste formeront l'ectoderme. Au fur et à mesure que les cellules immigrent, l'épiblaste latéral est entrainé vers la ligne primitive (flèches vertes).

D'après Nayaka, Y., Sheng., G. : **An amicable separation : Chick's way of doing EMT**. Cell Adhesion Migration 2009, **3 :** 160-163. Fig. 9.34 Mouvements en « polonaise » au sein de l'épiblaste de poulet pendant la formation de la ligne primitive. Schéma de gauche : avant la ponte de l'œuf, les mouvements cellulaires dans l'épiblaste commencent à amener des cellules vers le site d'apparition de la ligne primitive. Schéma central : 6-7 heures après la ponte (stade 2), les cellules de l'épiblaste montrent des mouvements de polonaise caractéristiques, s'écartant de la ligne médiane côté antérieur et se rapprochant postérieurement de la ligne primitive en formation. Celle-ci commence son extension convergente et s'allonge par intercalation médio-latérale (voir Encart 9C). Schéma de droite : 12-13 heures après la ponte (stade 3), la ligne atteint la moitié de sa longueur finale ; les cellules épiblastiques situées à son front se déplacent vers l'avant.

D'après Voiculescu, O., et al. : **The amniote** primitive streak is defined by epithelial cell intercalation before gastrulation. Nature 2007, **449 :** 1049-1052.



de cellules. Elle s'étend progressivement vers l'avant tandis que les cellules de l'épiblaste, immigrent en dessous d'elle (voir Figs 3.15, 3.16, 3.17 et Fig. 4.11). Les cellules épiblastiques restant en surface formeront l'ectoderme. Après leur internalisation, les cellules migrent et s'organisent en feuillets mésodermique et endodermique. L'embryon s'allonge à la fois par prolifération cellulaire et extension convergente.

Les mouvements et les modifications de comportement des cellules épiblastiques au cours de la formation de la ligne primitive sont moins bien compris que ceux de l'involution chez le xénope, bien que beaucoup d'entre eux se révèlent communs. La délamination et le mouvement des cellules épiblastiques au sein de la ligne sont le résultat d'un ensemble de processus coordonnées. Les transitions épithélio-mésenchymateuses combinant constriction apicale, perte de jonctions adhérentes et destruction de la lame basale, commencent à l'extrémité postérieure de la ligne et progressent vers l'avant. En même temps que s'effectue l'extension convergente de l'épiblaste, *brachyury* est exprimé au niveau de la ligne primitive et révèle, comme chez le xénope (voir Fig. 9.29), les cellules en immigration.

Pour certains auteurs, l'extension de la ligne primitive serait permise par la convergence de cellules au niveau de son extrémité postérieure. De plus, la contraction et l'immigration des cellules au niveau de la ligne entraîneraient les cellules de l'épiblaste vers (et dans) la ligne primitive. Chez le poulet, la formation de la ligne primitive est précédée de nombreux mouvements de cellules de l'épiblaste antérieur qui convergent de façon symétrique et circulaire vers la zone postérieure où la ligne prend naissance (Fig. 9.34), mouvements dit en « polonaise » en référence à une danse du XVII^e siècle. Des enregistrements en vidéomicroscopie haute résolution de l'épiblaste montrent que ces mouvements sont essentiellement dus à une extension convergente. L'intercalation des cellules à proximité de la ligne primitive génère des forces qui provoquent le déplacement de cellules ailleurs dans l'épiblaste. Comme dans le cas de l'élongation de l'axe chez les amphibiens et le poisson-zèbre, cet exemple d'extension convergente implique la voie Wnt de polarité cellulaire planaire (voir Encart 9C), l'inhibition de celle-ci bloquant la formation de la ligne primitive.

À l'aplomb de la ligne primitive, les cellules forment une masse de mésenchyme qui s'étale progressivement sous la partie ectodermique de l'épiblaste. Les précurseurs des différents tissus endodermiques et mésodermiques émergent de la ligne dans un ordre défini. L'endoderme est produit le premier, puis viennent le mésoderme cardiaque et enfin celui de la chorde. Comme chez l'oursin et la drosophile, la migration des cellules mésodermiques est dépendante des FGF. Le FGF-4 produit par le processus céphalique en formation agit en chimioattractant pour les cellules mésodermiques de la partie antérieure de la ligne, tandis que le FGF-8 produit par la ligne elle-même les repousse. La balance entre ces signaux attractifs et répulsifs détermine la destination finale des cellules mésodermiques. Ces mécanismes de contrôle de la mise en place du mésoderme par les FGF semblent avoir été remarquablement conservés au cours de l'évolution.

La gastrulation chez la souris se produit de façon similaire à celle du poulet, mais l'épiblaste de souris est sous forme d'une coupelle et non d'un disque (voir Fig. 3.23). Cette topologie différente modifie le déroulé de la gastrulation. La ligne primitive se met en place dans une zone de la bordure de la coupelle, identifiant ainsi la région postérieure de l'embryon. Les cellules pénètrent dans la ligne depuis le côté intérieur de la coupelle, ce qui conduit à ce que l'endoderme, issu des cellules pénétrant en premier, forme le feuillet le plus externe de l'embryon précoce, et non le plus interne (voir Fig. 3.24). Ensuite, comme chez le poulet, la ligne progresse vers le côté antérieur et les cellules formant différents dérivés mésodermiques se mettent en place dans son sillage au fur et à mesure de leur migration sous l'épiblaste (qui formera l'ectoderme). Plus tard, au cours du développement, l'embryon renverse sa conformation et l'endoderme se retrouve en position interne (voir Fig. 3.26). Ce processus est spécifique des rongeurs. Chez l'espèce humaine, le blastoderme est plat et la gastrulation ressemble à celle du poulet, la ligne primitive se formant à la surface supérieure de l'épiblaste.

Comme chez le poulet, la gastrulation de la souris s'accompagne de l'expression de *brachyury* au niveau de la ligne primitive et des transitions épithélio-mésenchymateuses. De même, la signalisation FGF est impliquée dans l'éloignement des cellules de la zone de la ligne après leur immigration. La signalisation Wnt est également nécessaire. Toutefois, des études récentes d'imagerie *in vivo* n'ont pas mis en évidence des mouvements de polonaise dans l'épiblaste ni d'extension convergente avant la formation de la ligne primitive. Des criblages de mutations ont confirmé l'implication des transitions épithélio-mésenchymateuses et des mouvements cellulaires, beaucoup de mutations de gènes contrôlant la dynamique du cytosquelette empêchant la gastrulation chez la souris.

RÉSUMÉ

À la fin du clivage, l'embryon d'un animal est essentiellement constitué d'un feuillet cellulaire continu, souvent sous forme d'une sphère creuse renfermant un liquide. La gastrulation transforme ce feuillet en une structure embryonnaire tridimensionnelle. Pendant la gastrulation, des cellules migrent de l'extérieur vers l'intérieur de l'embryon, les feuillets endodermiques et mésodermiques se positionnant de manière appropriée à l'intérieur de l'embryon. La gastrulation est le résultat d'un ensemble coordonné dans l'espace et dans le temps de mouvements cellulaires et de modifications de forme et d'adhésivité cellulaires. Les principales forces responsables des changements morphologiques sont générées par des modifications de motilité cellulaire et des contractions cellulaires localisées. Chez l'oursin, la gastrulation se fait en deux phases. Des modifications de forme et d'adhérence permettent à des cellules du futur mésoderme localisées dans une petite zone de la paroi du blastocœle, de réaliser une transition épithélio-mésenchymateuse et de migrer vers l'intérieur puis le long de la face interne de la paroi. Suit l'invagination de la zone épithéliale adjacente de la blastula, le futur endoderme à l'origine du tube digestif. Les cellules du mésenchyme primaire explorent leur environnement par des filopodes qui orientent le déplacement des cellules vers les régions de la paroi avec lesquelles ils interagissent de la façon la plus stable. Ainsi, ce sont des signaux de guidage présents dans la matrice qui permettent aux cellules d'atteindre leurs positions finales. Dans la seconde phase, des réarrangements cellulaires au sein de l'endoderme permettent l'allongement du tube digestif vers la future région orale par extension convergente et grâce à la traction exercée par des filopodes émis par l'extrémité de l'archentéron vers la paroi du blastocœle. Chez la drosophile, l'invagination du mésoderme se fait par des mécanismes similaires ; l'extension de la bandelette germinative est permise par un remodelage myosine-dépendant des jonctions cellulaires et une intercalation cellulaire à l'origine d'une extension convergente. Chez les vertébrés, la gastrulation implique des mouvements plus complexes

qui conduisent généralement à l'allongement antéro-postérieur de l'embryon. Chez le xénope, elle se réalise par trois processus : (1) l'involution, par lequel un double feuillet d'endoderme et de mésoderme s'enroule vers l'intérieur au niveau de la lèvre du blastopore, (2) une extension convergente de l'endoderme et du mésoderme selon l'axe antéro-postérieur, formant respectivement le toit de l'archentéron et la chorde accompagnée du mésoderme somitique, (3) l'épibolie de l'ectoderme qui recouvre l'ensemble de l'embryon à partir de la calotte animale. Extension convergente et épibolie sont dues à des intercalations cellulaires. L'extension convergente de l'axe antéro-postérieur utilise la « version vertébré » de la voie de signalisation Wnt de polarité cellulaire planaire et nécessite une orientation antéro-postérieure pré-établie au sein de mésoderme. La gastrulation chez le poulet et de la souris implique un processus de délamination et l'immigration de cellules individuelles de l'épiblaste à travers la ligne primitive vers l'intérieur de l'embryon, où elles forment le mésoderme et l'endoderme.



La formation du tube neural

Chez les vertébrés, la neurulation met en place le **tube neural**, un tube épithélial dérivé de l'ectoderme dorsal qui formera le cerveau et la moelle épinière. Après induction par le mésoderme au cours de la gastrulation (voir Chapitre 5), la zone ecto-dermique qui donnera le tube neural apparaît sous forme d'une zone épaissie, la **plaque neurale**, dans laquelle les cellules épithéliales sont cylindriques, plus hautes que les cellules de l'ectoderme adjacent. Cette plaque s'enroule en un tube à l'origine du système nerveux. Dans ce chapitre, sera abordée la formation du tube lui-même, la mise en place du système nerveux à partir des cellules du tube neural étant étudiée dans le Chapitre 12.

Le tube neural des vertébrés est construit par deux mécanismes différents en fonction des régions du corps. Le tube neural antérieur forme le cerveau et le système nerveux central du tronc ; il est pour l'essentiel issu du repliement de la plaque neurale en un tube (la **neurulation primaire**) même si, chez les oiseaux et les mammifères, une population de cellules de type cellules souches participe à la construction du système nerveux du tronc (voir Section 5.8). Au-delà de la région lombo-sacrée, le tube neural postérieur se développe à partir de cellules de type cellules souches situées dans le bourgeon de la queue. Celles-ci construisent une baguette pleine de cellules mésenchymateuses qui réalisent ensuite une transition mésenchymo-épithéliale, mettant ainsi en place une lumière centrale qui se connecte par la suite avec celle du tube neural antérieur. Ce processus constitue la **neurulation secondaire**. Il existe toutefois des variantes au sein des vertébrés ; chez le poisson-zèbre ou d'autres poissons, par exemple, l'ensemble de la plaque neurale forme d'abord une tige pleine, qui se creuse ensuite d'une cavité. Ici sera étudiée principalement la neurulation primaire de l'embryon de poulet.

9.14 La formation du tube neural est due à des changements de forme cellulaire et à une extension convergente

L'embryon de poulet sert de bon modèle de la neurulation chez les mammifères et son étude est plus aisée. La Fig. 9.35 montre la neurulation dans la zone céphalique du poulet. Elle commence par la formation d'un **sillon neural**, suivie d'un repliement de la plaque neurale le long de la ligne médiane. Les bords de la plaque neurale s'élèvent au-dessus du plan de l'épithélium, formant deux **replis neuraux** parallèles encadrant une dépression, la **gouttière neurale**. Enfin, les replis neuraux se rejoignent et fusionnent dans le plan médian dorsal de l'embryon, formant le tube neural qui se sépare ensuite de l'ectoderme adjacent. Chez les amphibiens, le tube neural se ferme simultanément sur toute sa longueur. Chez le poulet, la fermeture débute dans la région du cerveau moyen et s'étend progressivement vers l'avant et vers l'arrière ; chez les mammifères, elle se produit à des moments différents selon les régions.

La couche superficielle de l'ectoderme devient l'épiderme et les cellules formant la limite entre la plaque neurale et le futur épiderme donnent les **crêtes neurales**. Cette population cellulaire s'individualise de chaque côté de la surface dorsale du tube, juste avant et après la fermeture de ce dernier, et migre pour former un large éventail de tissus différents. Les cellules des crêtes neurales sont à l'origine du système nerveux périphérique, des mélanocytes de la peau, et même de certains tissus de la face. Elles sont étudiées ainsi que leurs migrations plus bas dans ce chapitre.

La neurulation est provoquée par l'activité de sous-populations cellulaires restreintes et spatialement définies, localisées le long de la ligne médiane de la plaque neurale, de ses limites avec le futur épiderme et dans les flancs des replis neuraux. Les cellules limitant la plaque neurale sont sous la contrainte mécanique de l'ectoderme voisin et réagissent par une constriction apicale. Les cellules médianes de la plaque neurale font de même, ce qui provoque le repliement de la plaque neurale au niveau du **point de flexion médian** et la formation du sillon neural (Fig. 9.36). L'ensemble des forces mises en place par ces modifications de forme cellulaire provoque l'élévation des bords de la plaque neurale qui forment les bourrelets neuraux. Cette

Fig. 9.35 La flexion de la plaque neurale et la fusion des replis neuraux forment le tube neural. La flexion bilatérale de la plaque neurale vers l'intérieur crée la gouttière neurale, bordée par les replis neuraux. Ceux-ci en fusionnant forment un tube épithélial, le tube neural, qui s'individualise du reste de l'ectoderme qui devient de l'épiderme. Les cellules des crêtes neurales se détachent de la partie dorsale du tube et s'en éloignent par migration.

D'après Yamaguchi, Y., Miura, M. : **How to form and close the brain : insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals**. Cell. Mol. Life Sci. 2013, **70 :** 3071-3186.





Fig. 9.36 Modification de la morphologie cellulaire dans la plaque neurale pendant la neurulation du poulet. Les cellules du centre de la plaque neurale en devenant trapézoïdales après une constriction apicale, définissent un point de flexion médian. Des points de flexion dorso-latéraux supplémentaires se forment sur les côtés du sillon et participent au rapprochement des replis neuraux. Les micrographies électroniques montrent les stades successifs de la neurulation de l'embryon de poulet ; les coupes sont approximativement au niveau du futur mésencéphale (cerveau moyen).

Illustration d'après Schoenwolf, G.C., Smith, J.L. : **Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances.** Development 1990, **109 :** 243-270. Photographies aimablement communiquées par G. Schoenwolf d'après Colas, J.-F., Schoenwolf, G.C. : **Towards a cellular and molecular understanding of neurulation**. Dev. Dyn. 2001, **221 :** 117-145.

Illustration à gauche d'après Harding, B. N. & Copp, A. J. in Greenfield's Neuropathology 357-483 (Arnold, London, 2002). Au milieu et à droite d'après Juriloff and Harris. **Mouse models for neural tube closure defects**. Human Molecular Genetics 2000, **9**: 993-1000. étape importante est indispensable à la formation du tube et, en son absence, la neurulation n'aboutit pas.

Les bourrelets neuraux sont rapprochés l'un de l'autre par deux mouvements coordonnés au sein de la plaque neurale. Le premier et le plus important mouvement est une extension convergente similaire à celles observées lors de la gastrulation. Elle réduit la largeur de la plaque neurale, rapprochant ainsi les replis l'un de l'autre, et provoque l'allongement du tube neural en formation, accompagné de celui du reste du corps, selon l'axe antéro-postérieur. Des structures médianes, comme la chorde, semblent à l'origine des signaux permettant l'orientation des cellules de la plaque neurale nécessaire à cette extension convergente. Le second mouvement modifie la forme des replis neuraux. Des cellules situées dans le flanc médian des replis deviennent trapézoïdales, en partie par constriction apicale, et forment deux **points de flexion dorso-latéraux** (voir Fig. 9.36). Ainsi, chaque bourrelet se déforme vers le plan médian et les sommets de ces replis neuraux pointent l'un vers l'autre.

Comme dans beaucoup d'autres situations, la constriction apicale des cellules des points de flexion est attribuée à la contraction en « cordon de bourse » de l'actomyosine illustrée dans l'Encart 9B.

La dernière étape est la **fermeture du tube neural**. Les cellules du sommet des replis neuraux développent des lamellipodes et des filopodes qui s'entremêlent lorsque les plis se rencontrent. Les bords de ces derniers fusionnent et le tube s'individualise du reste de l'ectoderme, qui se referme au-dessus de lui (voir Fig. 9.35). Les replis se lient si étroitement que la lumière peut quasiment disparaître et ne réapparaître qu'après la fusion réalisée.

La séparation entre le tube neural, initialement intégré dans l'ectoderme, et l'épiderme présomptif est le résultat d'une modification de l'adhésivité cellulaire. Chez le poulet, les cellules de la plaque neurale, comme le reste de l'ectoderme, présentent à leur surface la molécule d'adhérence L-CAM (voir Encart 9A). Cependant, lors de la formation des plis neuraux, elles commencent à exprimer la N-cadhérine et la N-CAM, alors que l'ectoderme adjacent exprime la E-cadhérine. Ces différences pourraient aider à l'individualisation du tube neural et lui permettre de s'enfoncer sous la surface, le reste de l'ectoderme se reformant au dessus en une couche continue.

La fermeture du tube neural est un événement complexe qui requiert, en plus de modifications d'expression génique sous l'effet de facteurs de transcription, les

ENCART 9D Les récepteurs Eph et leurs ligands éphrine

Les récepteurs Eph et leurs ligands éphrine sont des protéines membranaires capables de générer des interactions attractives ou répulsives entre cellules. Compte tenu de leur localisation membranaire, ils ne peuvent agir que par contact cellule/cellule direct, comme Notch et Delta. Leur rôle de molécules de guidage contact-dépendant des axones en croissance dans le système nerveux est bien connu, particulièrement dans le cas du guidage des axones des neurones rétiniens vers les centres visuels du cerveau ; ce rôle est étudié dans le Chapitre 12. Ils agissent également comme molécule de guidage pour les cellules des crêtes neurales en migration et semblent impliqués dans les stades ultimes de la formation des somites, lors de l'individualisation d'un nouveau somite à partir du mésoderme pré-somitique. Des travaux chez la souris ont suggéré qu'Eph et éphrines sont nécessaires à l'établissement des circuits neuronaux locaux dans la moelle épinière qui permettent de réaliser des pas alternés, plutôt que des bonds comme un lapin.

Les 14 récepteurs Eph connus chez les mammifères se répartissent en deux classes structurales : EphA (EphA1-EphA8 et EphA10) et EphB (EphB1-EphB4 et EphB6). De même les éphrines se classent en éphrines A (éphrine A1 à A5) et éphrines B (éphrine B1 à B3). Les récepteurs de type B lient les éphrines B et les récepteurs de type A, les éphrines A, à l'exception de EphA4, qui peut recevoir des éphrines A et B. La liaison ligand-récepteur déclenche un signal bidirectionnel, Eph et l'éphrine étant chacun à l'origine d'une transduction dans sa propre cellule porteuse (Figure 1). Contrairement à la majorité des voies de signalisation déjà rencontrées, la cible principale de cette voie Eph-éphrine est le cytosquelette d'actine, dont le réarrangement provoque les modifications de morphologie cellulaire et un comportement à l'origine de la répulsion.

Les Eph sont des récepteurs à activité tyrosine-kinase, avec un domaine intracellulaire de type kinase. Les éphrines en se liant sur un récepteur Eph déclenchent un signal activant une kinase cytoplasmique. Les interactions Ephrine-Eph sont bien connues pour déclencher une répulsion entre les cellules, comme cela se passe à l'interface entre rhombomères (voir Section 12.4), mais elles peuvent aussi provoquer une attraction et une adhérence. Il n'est pas évident de prédire l'action d'une paire Eph/éphrine particulière. Elle dépend de multiples facteurs, dont la nature



des cellules impliquées, le nombre de récepteurs présents et leur degré d'agrégation au sein de la membrane.

Il est paradoxal que l'interaction entre Eph et éphrine puisse déboucher sur une répulsion, compte tenu de leur affinité l'un pour l'autre. Il a été démontré que la répulsion par les éphrines A nécessite le clivage de leur domaine extracellulaire (ce qui permet donc la séparation cellulaire). L'internalisation des complexes Eph-éphrine par endocytose a aussi été prouvée. Les interactions répulsives semblent nécessiter un niveau assez élevé de signalisation tyrosine kinase par Eph. Si cette activité est absente ou à faible niveau, l'interaction Eph-éphrine tend à promouvoir l'adhérence cellulaire.

La fermeture du tube neural de souris illustre ce phénomène. À la suite d'un épissage alternatif, les cellules des replis neuraux produisent une forme de EphA7 dépourvue de son domaine kinase, et expriment aussi l'éphrine A5. Les interactions adhésives entre EphA7 et éphrine A5 sont essentielles pour la fermeture du tube neural. Des mutants de souris dépourvus d'éphrine A5 présentent des défauts du tube neural rappelant l'anencéphalie humaine : le tube neural ne se ferme pas du côté du crâne, le cerveau antérieur ne se développe pas et le fœtus est en général mort-né. Dans les tissus autres que le tube neural, EphA7 est produit avec son domaine tyrosine kinase intact et son interaction avec l'éphrine A5 provoque la répulsion entre les cellules.

activités coordonnées de nombreux types de protéines : protéines d'adhérence et de signalisation comme les cadhérines, les éphrines et leurs récepteurs (Encart 9D), les constituants cytosquelettiques et leurs régulateurs d'activité.

Le nombre de processus biologiques impliqués dans l'élévation des replis neuraux et la fermeture du tube neural, explique qu'il n'est pas surprenant d'observer des défauts de fermeture avec une fréquence relativement importante. Les défauts de neurulation sont parmi les anomalies congénitales les plus fréquentes (1/1 500 naissances). Pour leurs formes les plus sévères, elles sont létales dès la naissance ou dans les premiers jours de la vie. Le type de **défaut du tube neural** (ou NTD pour *Neural Tube Defect*) dépend de la région du tube neural impliquée (Encart 9E).

ENCART 9E Les malformations du tube neural

Les anomalies de neurulation ont été étudiées de façon approfondie chez la souris, puisque des mutations spontanées affectant le développement du tube neural sont connues, et surtout, qu'il est aussi possible de mener des criblages de mutagenèse à grande échelle dans cette espèce (voir Section 3.9). Plus de 60 gènes différents, suite à une mutation, donnent des malformations du tube neural similaires à celles observées chez l'homme. Chez l'homme comme chez la souris, les replis neuraux se soulèvent à différents moments dans des régions distinctes, et la fermeture du tube est initiée dans des sites particuliers de ces régions. La Figure 1 montre à gauche les sites d'initiation de la fermeture dans un embryon de souris. La fermeture commence à E8,5 à la



À gauche d'après Harding, B. N. & Copp, A. J. in Greenfield's Neuropathology 357-483 (Arnold, London, 2002). Au milieu et à droite d'après Juriloff and Harris. **Mouse models** for neural tube closure defects. Human Molecular Genetics 2000, **9**: 993-1000.

Figure 1

jonction entre le cerveau postérieur (rhombencéphale) et la région cervicale (site 1 dans la Figure 1), point à partir duquel elle progresse vers l'avant et l'arrière. Du côté postérieur, elle va jusqu'au neuropore postérieur, qui constitue l'extrémité du tube neural troncal, le tube neural étant formé dans la région de la queue par la neurulation secondaire. La fermeture débute un peu plus tard à un second site (site 2) à la limite cerveau antérieur (prosencéphale)/cerveau moyen (mésencéphale), puis à un troisième site à l'extrémité antérieure du tube neural (site 3) à partir duquel elle progresse vers l'arrière pour rencontrer la fermeture issue du site 2 au niveau du neuropore antérieur.

En fonction de la zone concernée, un défaut dans la mise en place des replis neuraux ou la fermeture du tube neural provoque différentes malformations, dont l'anencéphalie, le rachischisis, le craniorachischisis et le *spina bifida* (Figure 1, milieu et droite). L'anencéphalie (exencéphalie chez la souris) est une malformation létale provoquée par une mauvaise mise en place du tube neural dans la région du prosencéphale ou du mésencéphale. Le rachischisis est dû à un défaut de fermeture de la moelle épinière, le craniorachischisis à un défaut de fermeture entre le mésencéphale et le bas de la colonne vertébrale. Le *spina bifida* est le résultat d'un défaut de fermeture du tube neural au niveau du neuropore postérieur qui entraîne la malformation de la colonne vertébrale à cet endroit. Dans l'espèce humaine, la forme la plus sévère est le myéloméningocèle, où la moelle épinière et les méninges forment une protrusion qui passe à travers le défaut de la colonne vertébrale. Cette forme de *spina bifida* est, en général, très invalidante même après un traitement correctif, car certaines fonctions de la moelle sont souvent perdues. Dans l'espèce humaine, ces défauts apparaissent à 4 semaines de gestation, au moment où le tube neural se forme.

L'étude des mutants de souris présentant ces phénotypes montre que des régulateurs de l'assemblage ou de la fonction de l'actomyosine, comme les éléments de la voie de signalisation Wnt de polarité cellulaire planaire qui affectent le cytosquelette (voir Encart 9C) sont indispensables pour la bonne fermeture du tube neural. Par exemple, des embryons de souris dépourvus de Dishevelled, Flamingo ou les protéines Vang de vertébrés, Vanglike1 et 2, présentent un craniorachischisis.

RÉSUMÉ

Chez les vertébrés, l'induction du tissu nerveux par le mésoderme pendant la gastrulation précède la neurulation, c'est-à-dire la formation du tube nerveux, qui donnera le cerveau et la moelle épinière. Chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens, la neurulation implique le repliement de la plaque neurale en un tube, au niveau de la tête et du tronc, et la formation d'une cavité centrale au sein d'une baguette cellulaire pleine au niveau de la queue. La formation des replis neuraux et leur rencontre au niveau médian qui permet la fermeture du tube neural, est assurée par des changements de forme cellulaire et une extension convergente au sein du tube, mais aussi par des forces générées par les tissus adjacents. Des modifications d'adhésivité cellulaire assurent la séparation du tube neural de l'ectoderme sus-jacent. Compte tenu de la complexité des phénomènes permettant la fermeture du tube neural, les anomalies sont assez fréquentes et sont à l'origine de maladies comme le *spina bifida*.

Migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus fréquent au cours de la morphogenèse animale et peut se faire sur de grandes distances. Dans ce chapitre, seront décrits trois exemples de migration cellulaire, celles des **cellules des crêtes neurales** des vertébrés et des **cellules de la ligne latérale** des poissons, et un exemple de cellules mobiles qui ensemble entraînent un feuillet épithélial lors de la **fermeture dorsale** chez la drosophile. Les cellules des crêtes neurales sont caractéristiques des vertébrés et se différencient en de nombreux types cellulaires différents.

D'autres exemples de migration cellulaire peuvent être trouvés ailleurs dans le livre. La migration des cellules germinales depuis leur site de formation vers les gonades est décrite pour le poisson-zèbre et la souris au Chapitre 10, la migration de cellules somitiques vers les membres, où elles formeront des cellules musculaires, est discutée dans le Chapitre 11, et la migration des neurones immatures au sein du système nerveux central dans le Chapitre 12.

9.15 Les cellules des crêtes neurales se différencient en une large gamme de types cellulaires différents

Les cellules des crêtes neurales de vertébrés sont issues des bords de la plaque neurale et sont identifiables à partir de la neurulation (voir Section 5.14). Elles émergent du tube neural juste avant et après la fusion des replis neuraux, sous forme de cellules individuelles. Une fois détachées de l'épithélium nerveux, elles migrent vers de nombreux sites, où elles se différencient en un nombre remarquable de types cellulaires différents.

Les cellules des crêtes neurales sont à l'origine des neurones et de la glie du système nerveux périphérique (en particulier le système sensoriel et le système nerveux autonome), de cellules endocrines comme les cellules chromaffines des médullo-surrénales, de certaines structures cardiaques (voir Section 11.32) et des mélanocytes, les cellules pigmentées de la peau (voir Fig. 5.38). Chez les mammifères et les oiseaux, les cellules des crêtes neurales donnent aussi les os, cartilage et derme de la tête, alors que ces tissus sont d'origine mésodermique dans les autres parties du corps.

9.16 La migration des cellules des crêtes neurales est contrôlée par des signaux environnementaux

Les cellules des crêtes neurales de vertébrés dérivent de l'épithélium formant les bords de la plaque neurale. Elles sont caractérisées au cours de la neurulation par l'expression de facteurs de transcription des familles Snail et Slug. Au moment de la fermeture du tube neural, elles forment un mésenchyme lâche émergeant dorsalement de chaque côté de la ligne médiane. La présence de Snail et Slug induit une transition épithélio-mésenchymateuse (voir Fig. 9.4). Les cellules, guidées par des signaux chimiques, migrent ensuite individuellement sur les deux côtés du tube. La Fig. 9.37 montre des cellules des crêtes neurales migrant en culture.

La migration des cellules des crêtes neurales peut être suivie chez le poulet en marquant ces cellules avec un fluorochrome comme le DiI, ou par l'expression dans le tube neural d'une GFP photoactivable dont la fluorescence peut être activée par un faisceau lumineux focalisé précisément, et qui permet de suivre des petits groupes de cellules, voire des cellules isolées. La Fig. 5.37 est une illustration de cellules des crêtes neurales de poisson-zèbre en migration, portant un transgène rapporteur constitué de la séquence codant la GFP associée au promoteur d'un gène (*Sox10*) exprimé dans ces cellules.

Dans le tronc de l'embryon de poulet, les cellules des crêtes neurales empruntent deux voies principales de migration (Fig. 9.38). La voie dorso-latérale passe entre l'ectoderme et les somites ; les cellules migrantes donneront principalement les cellules pigmentaires de la peau et des plumes. La deuxième voie est plus ventrale, et sera principalement à l'origine des ganglions sympathiques et sensoriels. Certaines cellules migrantes se déplacent dans les somites pour former les ganglions rachidiens Fig. 9.37 Cellules des crêtes neurales de xénope migrant en culture. Les lamellipodes du côté en progression des cellules sont en rouge, les membranes cellulaires en jaune et les noyaux en bleu. La photographie de droite est un grossissement.

Images aimablement communiquées par Roberto Mayor, (a) publiée initialement dans Kuriyama, S. et al. : Journal of Cell Biology, 2014, **206**: 113-127.



sensoriels des racines dorsales ; d'autres cellules migrent à travers les somites pour former les ganglions sympathiques et la médullo-surrénale, mais évitent apparemment la région de la chorde. Les cellules des crêtes neurales du tronc migrent sélectivement à travers la moitié antérieure des somites et évitent la moitié postérieure. Au sein de chaque somite, les cellules des crêtes neurales sont retrouvées dans la moitié antérieure même si elles étaient initialement dans des crêtes voisines de la moitié somitique postérieure. Ce comportement est très différent de celui des cellules de la voie dorso-latérale, qui migrent sur toute la surface du somite.

Cette migration restreinte à la partie antérieure de chaque somite est à l'origine de l'organisation segmentée des ganglions rachidiens des vertébrés, avec une paire de ganglions pour chaque paire de somites dans l'embryon (Fig. 9.39). Le parcours segmenté de la migration est le résultat de la présence de signaux de guidage différents dans les deux moitiés du somite. Si un somite est retourné de 180°, les cellules migrent quand même à travers la partie initialement antérieure qui se trouve pourtant en position postérieure.

L'évitement de la moitié postérieure des somites par les cellules des crêtes neurales est probablement dû à des interactions entre éphrines et leurs récepteurs Eph (voir Encart 9D). Chez le poulet, l'éphrine B1, localisée dans la moitié postérieure



Fig. 9.38 Migration des cellules des crêtes neurales au niveau du tronc chez l'embryon de poulet. Un groupe de cellules (1) migre sous l'ectoderme et donne des cellules pigmentaires (en pointillé). Un deuxième groupe (2) migre sur le tube neural puis traverse la partie antérieure des somites, mais jamais la partie postérieure. Ce groupe est à l'origine des ganglions rachidiens, des ganglions sympathiques et des cellules de la médullo-surrénale (sites représentés en pointillés). Les cellules situées en face de la région postérieure d'un somite migrent dans les deux directions le long du tube neural jusqu'à atteindre une région antérieure de somite. La migration présente donc une distribution segmentée, à l'origine de la répartition segmentée des ganglions.

des somites, provoque une répulsion des cellules des crêtes neurales qui expriment EphB3. La moitié antérieure des somites que les cellules traversent, exprime quant à elle EphB3. D'autres protéines membranaires, comme les **sémaphorines**, sont aussi impliquées dans ce guidage répulsif des cellules des crêtes neurales. Ces interactions expliquent ainsi, au niveau moléculaire, la disposition segmentée des ganglions rachidiens.

Le tube neural et la chorde interviennent aussi dans la migration des cellules des crêtes neurales. Si le tube neural est retourné à 180° (face dorsale en position ventrale) avant que la migration ne commence, la plupart des cellules des crêtes neurales migrent alors vers le haut à travers le sclérotome, en restant confinées à la moitié antérieure des somites. Ceci suggère que le tube neural, d'une façon ou d'une autre, intervient dans la définition de la direction de migration des cellules de crêtes neurales. La chorde joue également un rôle en inhibant la migration des cellules dans un rayon de 50 µm et empêche donc les cellules des crêtes neurales de l'approcher.

La migration des cellules des crêtes neurales est sans doute orientée par chimiotactisme vis-à-vis de signaux chimiques particuliers. Elle résulte d'une polarisation des cellules dans une direction particulière, probablement sous l'effet de la voie de signalisation de polarité cellulaire planaire passant par Wnt (voir Encart 9C). L'inhibition de constituants de cette voie, comme Wnt et Frizzled, supprime la migration des cellules des crêtes neurales.

Les cellules des crêtes neurales sont guidées par des interactions avec la matrice extracellulaire dans laquelle elles se déplacent tout autant que par des interactions cellulaires. Elles interagissent avec la matrice extracellulaire par des intégrines présentes à leur surface (voir Encart 9A). En culture *in vitro*, les cellules des crêtes neurales d'oiseau adhérent et migrent efficacement sur la fibronectine, la laminine et différents collagènes. Le blocage de la sous-unité β_1 des intégrines *in vivo* permet d'inhiber l'adhérence à la fibronectine et à la laminine, et provoque des anomalies sévères dans la région de la tête, mais pas dans le tronc, ce qui suggère des modalités différentes d'adhérence dans ces deux régions impliquant probablement d'autres intégrines. La migration préférentielle en culture des cellules des crêtes neurales sur un substrat de fibronectine est manifeste, bien que le rôle de cette molécule dans le guidage cellulaire *in vivo* reste encore peu clair.

9.17 La mise en place de l'ébauche de la ligne latérale des poissons est un exemple de migration cellulaire collective

Dans certains cas, des cellules peuvent migrer en groupe en restant liées par des jonctions adhésives. Ce processus est par exemple observé lors de la formation de l'ébauche de la ligne latérale des poissons, ensemble d'organes sensoriels distribués le long du corps et formant un appareil sensoriel essentiel, par le primordium de la ligne latérale. Ce primordium est un groupe de plus d'une centaine de cellules ressemblant à une limace (Fig. 9.40), les cellules migrant collectivement sous la peau le long du flanc de l'embryon. Elles dérivent de l'ectoderme du crâne et se déplacent vers l'extrémité postérieure en suivant un itinéraire balisé par SDF-1 (pour Stromal Derived Factor 1, appelé aussi CXCL12), une protéine chimioattractive déposée au niveau du myoseptum, la membrane reliant les cellules musculaires sous-jacentes. SDF-1 est détectée par son récepteur CXCR4, exprimé par toutes les cellules du primordium mais actif uniquement dans les cellules du front de migration qui conduisent le déplacement. Ces cellules du front sont liées par des complexes jonctionnels plus lâches et plus dynamiques que les autres cellules et sont engagées dans une transition épithélio-mésenchymateuse partielle. Le primordium est dynamique : les cellules se divisent au cours du déplacement, et, à intervalles réguliers, un petit amas de cellules, à l'origine d'un organe sensoriel, est abandonné.

Des migrations collectives similaires sont observées chez la drosophile au cours de la mise en place du système arborescent des trachées qui conduit l'oxygène aux tissus (étudié dans le Chapitre 11). Les cellules situées à l'extrémité de chaque branche suivent une « piste » de signaux, entraînant la trachée en extension derrière elles.



Fig. 9.39 La migration des cellules des crêtes neurales est restreinte à la moitié antérieure des somites et explique la disposition segmentée des ganglions rachidiens. Les cellules des crêtes neurales ne peuvent pas migrer à travers la moitié postérieure (en gris) des somites, mais elles peuvent migrer le long du tube neural et à travers la moitié antérieure des somites (en jaune). Dans un segment, le ganglion rachidien dorsal, est donc constitué par des cellules des crêtes neurales issues de la région postérieure du segment antérieur, des cellules des crêtes neurales directement adjacentes (en blanc) et des cellules des crêtes neurales de sa propre partie postérieure.





Film montrant la formation de l'ébauche de la ligne latérale du poisson zèbre **Fig. 9.40** La migration cellulaire collective au cours de la mise en place de la ligne latérale du poisson-zèbre. En haut : photographie et schéma explicatif d'un embryon de poisson-zèbre indiquant la localisation de l'ébauche de la ligne latérale. A, antérieur ; P, postérieur. Cet embryon transgénique fabrique une protéine membranaire à ancrage glycosyl phosphatidylinositol couplée à la GFP qui permet la visualisation des membranes, et notamment la ligne latérale en développement dans l'embryon transparent. Au cours du déplacement du primordium depuis la région céphalique, guidé par une ligne du chimioattractant SDF-1, des rosettes de cellules sont abandonnées à intervalles réguliers qui formeront les organes sensoriels de la ligne latérale. Schéma central : vue générale des cellules en migration, la peau ayant été enlevée. À l'avant du primordium, les cellules expriment CXCR4, le récepteur de SDF-1 (pointillés rouge) ; à l'arrière, les cellules expriment aussi le récepteur de SDF-1, CXCR7. Schéma du bas : vue en coupe du primordium de la ligne latérale montrant le début de la formation des rosettes.

D'après Friedl, P., Gilmour, D. : Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009, 10: 445-457.

9.18 Les fermetures dorsale chez l'embryon de drosophile et ventrale chez celui de *Caenorhabditis elegans* se réalisent par l'entremise de filopodes

Certains événements morphogénétiques impliquent le déplacement d'un feuillet épithélial intact. La fermeture dorsale de l'embryon de drosophile en est un bon exemple. Lorsque, à mi-chemin de l'embryogenèse, la prolifération cellulaire cesse et que la bandelette germinative se rétracte, il reste un espace dans l'épiderme dorsal. Cet espace est couvert par un épithélium pavimenteux, l'amnioséreuse, qui est en continuité avec l'épiderme. La fermeture dorsale permet de combler cet espace et implique un mouvement coordonné des deux moitiés de l'épiderme l'une vers l'autre qui internalise l'amnioséreuse dans l'embryon, où elle disparaîtra par apoptose (Fig. 9.41).

La structure et les fonctions spécifiques du cytosquelette des cellules de l'épiderme et de l'amnioséreuse rendent possible ce processus. Dans l'épiderme, les cellules au contact de l'amnioséreuse remodèlent leurs jonctions dans le plan de l'épithélium et forment un câble supra-cellulaire d'actomyosine dont les contractions coordonnent les extensions des cellules vers la ligne médiane et donc le mouvement des deux moitiés de l'épiderme l'une vers l'autre. La contraction des cellules de l'amnioséreuse procure une force supplémentaire en tractant les feuillets épidermiques. Cette contraction est aussi responsable du mouvement des cellules de l'amnioséreuse vers l'intérieur de l'embryon, où elles finissent par entrer en apoptose et disparaître.

Le front de migration de l'épiderme met en place des filopodes et des lamellipodes, qui s'étirent sur 10 µm et qui portent des molécules de cadhérine à leur surface. Ces structures ne développent pas de force utile pour le déplacement. Par contre, elles jouent un rôle capital dans la fermeture finale lors de la rencontre des deux moitiés de l'épiderme. Ce mécanisme est aussi observé lors de la fermeture du tube neural.

La petite GTPase Rac est impliquée dans l'organisation des filaments d'actine au front des cellules, et à travers la voie de signalisation des kinases N-terminale c-Jun (JNK), dans le contrôle des modifications de forme cellulaire et dans la fusion cellulaire. La fermeture dorsale nécessite aussi que les caractéristiques segmentaires soient en parfaite coïncidence de part et d'autre de la fermeture et ceci est assuré par ces extensions. Le gène *engrailed*, par exemple, est exprimé sous forme d'une série de bandes transversales correspondant à la partie postérieure de chaque segment (voir Section 2.24). Les cellules exprimant *engrailed* d'un côté n'interagissent qu'avec les cellules exprimant *engrailed* de l'autre. De même les cellules exprimant *patched*, qui forment une série différente de bandes, ne fusionnent qu'avec les cellules de l'autre bord exprimant *patched*. L'ensemble permet un assemblage précis des bandes par-delà la suture (voir Fig. 9.41). **Fig. 9.41 Fermeture dorsale de l'embryon de drosophile**. (a) Embryon au début de la fermeture dorsale. L'expression du gène *puckered* (coloration brune), qui code une phosphatase régulant la voie de signalisation JNK (pour *Jun N-terminal Kinase*), révèle les cellules du bord de l'épiderme. Lorsque ces cellules sont déterminées, elles déclenchent une élongation de l'épiderme (flèches bleues) et une contraction des cellules de l'amnioséreuse (flèches rouges) qui permettent la fermeture coordonnée du feuillet épidermique. (b, c) Pendant les phases finales, l'épiderme se ferme depuis ses deux bordures grâce à des filopodes émis par les cellules des deux fronts. (d) L'expression des gènes *engrailed* (en vert) et *patched* (en rouge) montre l'alignement précis des cellules lors de la fermeture. Les cellules exprimant *engrailed* et *patched* fusionnant respectivement entre elles, la disposition des segments est préservée au travers de la suture.

(a-c) aimablement communiquée par Alfonso Martinez Arias; (d) d'après Millard, T.H., Martin, P. : Dynamic analysis of filopodial interactions during the zippering phase of Drosophila dorsal closure. Development 2008, **135**: 621-626.

Le recouvrement ventral de l'embryon de nématode se produit selon un processus comparable. À la fin de la gastrulation, l'hypoderme ne couvre que la région dorsale et la région ventrale en est dépourvue. L'hypoderme s'étend alors sur cette région jusqu'à ce que ses bords fusionnent le long de la ligne médiane. Des études en vidéo accélérée ont montré que la migration est initialement entraînée par quatre cellules, deux de chaque côté de la ligne médiane ventrale, qui émettent des filopodes vers cette dernière. Si ces filopodes sont détruits (ablation laser, ou traitement à la cytochalasine D qui empêche la polymérisation de l'actine et détruit les microfilaments), le recouvrement ne se fait pas, ce qui prouve le rôle moteur de ces filopodes. La suture utilise probablement des mécanismes similaires à ceux observés chez la mouche.

RÉSUMÉ

La migration cellulaire est un moteur important de la morphogenèse. Elle peut concerner des cellules individuelles ou des groupes de cellules, voire des épithéliums. Elle permet une redistribution des cellules ou une réorganisation des tissus. Les cellules des crêtes neurales migrent de part et d'autres du tube neural dorsal et forment une large gamme de tissus différents dans des localisations diverses. Leur migration est guidée par des signaux émis par d'autres cellules et par des interactions avec la matrice extracellulaire. La migration des cellules des crêtes neurales du tronc à travers la partie postérieure des somites est empêchée par des interactions répulsives entre éphrines présentes dans cette moitié postérieure des somites et récepteurs Eph portés par les cellules. Les cellules des crêtes neurales qui formeront les ganglions rachidiens s'accumulent donc au niveau de la partie antérieure de chaque somite, ce qui est à l'origine de la répartition segmentée des paires de ganglions selon l'axe antéropostérieur. À la différence des cellules des crêtes neurales qui migrent individuellement, la mise en place de la ligne latérale des poissons fournit un exemple de migration collective : un groupe de cellules migre comme une limace et sème des futurs organes sensoriels sous l'épiderme. Dans les deux cas, les cellules proviennent d'un épithélium et subissent une transition épithélio-mésenchymateuse. Celle-ci est complète dans le cas des cellules des crêtes neurales, et partielle dans le cas de la ligne latérale. Dans certains cas, c'est l'ensemble d'un épithélium qui bouge, comme dans le cas de la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile.







Film montrant la fermeture dorsale de l'embryon de drosophile

Dilatation dirigée

La pression hydrostatique peut être à l'origine de forces morphogénétiques. Il a déjà été vu comment une augmentation de la pression hydrostatique au sein du blastocyste de mammifère provoque une augmentation de volume et le maintien de la forme sphérique du blastocyste (Section 9.7). Seront considérés ici des exemples de **dilatation dirigée**, c'est-à-dire de cas où une augmentation de la pression hydrostatique est à l'origine d'une modification asymétrique de la forme, en raison de propriétés particulières de la structure. Par exemple, si la résistance des parois d'une structure est plus importante dans une direction que dans l'autre, une augmentation de pression provoquera un allongement dans l'axe de moindre résistance (Fig. 9.42).

9.19 L'extension tardive et la rigidification de la chorde sont obtenues par dilatation dirigée

Après sa formation, la chorde du xénope triple de volume et elle s'allonge considérablement en devenant plus rigide et plus résistante. À ce stade, la chorde est emballée dans un fourreau de matrice extracellulaire qui, de par sa structure moléculaire, empêche toute augmentation de diamètre mais ne limite pas l'extension selon l'axe antéro-postérieur. Comme les cellules aplaties de la chorde mettent en place des vacuoles remplies de liquide, l'ensemble des cellules augmente en volume selon l'axe antéro-postérieur. De plus, la présence des jonctions cellulaires contraint la direction dans laquelle les cellules initialement plates vont gonfler : l'expansion cellulaire se fait longitudinalement dans l'axe de la chorde. Le fourreau matriciel renferme des fibrilles de collagène qui le rendent résistant à une expansion en diamètre mais lui confère une élasticité ; il peut donc s'allonger. La chorde subit donc une extension directionnelle liée à la pression hydrostatique exercée par les cellules à laquelle s'associe la contrainte due à la composition du fourreau. L'augmentation de diamètre de la chorde est empêchée par la résistance du fourreau, ce qui fait que l'augmentation de volume (dilatation) orientée selon l'axe de la chorde, permet à celle-ci de s'allonger, de devenir droite et ferme sans se déformer.

Les vacuoles des cellules de la chorde sont remplies de glycosaminoglycanes qui tendent à attirer l'eau par osmose. Ce flux est responsable de l'augmentation de pression hydrostatique qui provoque l'augmentation de volume de la chorde ainsi que sa rigidité et sa rectitude. Les modifications de la structure du fourreau pendant la période d'élongation de la chorde sont en accord avec le mécanisme hydrostatique proposé. En effet, le fourreau contient des glycosaminoglycanes, qui ont peu de résistance à la traction, et des fibres de collagène qui ont, elles, une très grande résistance à la traction. Pendant la dilatation de la chorde, le nombre de fibres de collagène augmente, ce qui renforce la résistance à l'augmentation de diamètre. La digestion expérimentale du fourreau démontre son rôle puisque dans ce cas, la chorde se déforme et se replie, et les cellules de la chorde, au lieu d'être initialement plates, deviennent sphériques.

9.20 La contraction circonférentielle des cellules hypodermiques allonge l'embryon de nématode

Au cours du développement précoce du nématode, la forme de l'embryon ne change pas, la gastrula restant ovoïde, comme l'était l'œuf fécondé. Après la gastrulation, environ cinq heures après la fécondation, l'embryon commence à s'allonger rapidement selon l'axe antéro-postérieur : sa longueur est multipliée par quatre et sa circonférence diminue d'un facteur trois, ce processus durant environ deux heures.

L'élongation est provoquée par une modification de forme des cellules hypodermiques qui recouvrent l'embryon : leur destruction, réalisable au laser, empêche l'élongation. Ces cellules, initialement allongées selon la circonférence du corps, sont



Fig. 9.42 Dilatation dirigée. Une pression hydrostatique exerçant une contrainte à l'intérieur d'une structure ou d'une membrane peut entraîner un allongement. Si la résistance au niveau de la circonférence est plus grande que la résistance dans le sens longitudinal, comme dans le cas du fourreau de la chorde, la baguette de cellules à l'intérieur du fourreau s'allonge.



en fin d'élongation allongées dans l'axe antéro-postérieur (Fig. 9.43). Au cours de l'élongation, les cellules hypodermiques restent ancrées les unes aux autres par des jonctions cellulaires. Ces jonctions sont reliées à des fibres contenant de l'actine disposées sous la face apicale des cellules et selon la circonférence du corps, ces fibres se raccourcissant lors de l'allongement des cellules. La cytochalasine D, qui déstabilise les filaments d'actine et empêche leur polymérisation, est capable de bloquer l'élongation, ce qui souligne le rôle de ces filaments. Cette contraction circonférentielle des cellules hypodermiques augmente la pression hydrostatique à l'intérieur de l'embryon et contraint l'extension dans l'axe antéropostérieur. Des microtubules sont également détectés, avec la même orientation, et pourraient participer au processus. L'accroissement de la longueur du corps des nématodes est donc un autre exemple de dilatation dirigée.

RÉSUMÉ

La dilatation dirigée résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique dans une structure douée d'une résistance périphérique non homogène à cette pression. L'allongement de la chorde est provoqué par une dilatation dirigée. L'intérieur de la chorde augmente de volume mais l'augmentation de son diamètre est limitée par le fourreau de la chorde, ce qui la contraint à s'allonger. De façon analogue, l'embryon de nématode s'allonge après la gastrulation sous l'effet d'une contraction circonférentielle des cellules de l'hypoderme qui génère une pression sur les cellules internes et contraint l'embryon à s'allonger selon l'axe antéro-postérieur.

Résumé du Chapitre 9

- Les modifications morphologiques d'un embryon animal au cours de son développement sont principalement dues à des forces générées par des différences d'adhésivité cellulaire, des modifications de la forme cellulaire et des migrations cellulaires.
- Épithéliums et mésenchymes sont les deux principaux types d'organisation cellulaire dans un embryon. Les transitions épithélio-mésenchymateuses sont fréquentes au cours du développement. Les transitions mésenchymo-épithéliales existent aussi.
- Des divisions cellulaires, une compaction et une polarisation cellulaires permettent la formation d'une blastula sphérique creuse ou d'un blastocyste.
- La forme sphérique de la blastula est maintenue par un flux de liquide vers l'intérieur et par la pression hydrostatique qui en découle.

Fig. 9.43 Allongement du corps d'un nématode par dilatation dirigée. En haut : modification de la forme du corps observée en 2 heures. En bas : l'allongement est dû à une contraction circonférentielle des cellules hypodermiques. Le changement de forme d'une cellule est illustré par les flèches. Barre d'échelle : 10 μm.

Photographies reproduites avec l'autorisation de Priess, J.R., Hirsh, D.I. : **Caenorhabditis** elegans morphogenesis : the role of the cytoskeleton in elongation of the embryo. Dev. Biol. 1986, **117 :** 156-173. © 1986 Academic Press.

- Lors de la gastrulation, des mouvements importants de cellules permettent la mise en place de l'endoderme et du mésoderme à l'intérieur de l'embryon, préfigurant le plan d'organisation de l'animal.
- L'extension convergente joue un rôle majeur dans de nombreux processus au cours du développement, comme l'élongation de l'axe antéro-postérieur au cours de la gastrulation et celle de la chorde, l'allongement et la fermeture du tube neural des vertébrés et l'extension de la bandelette germinative de la drosophile.
- La formation du tube neural des vertébrés implique des modifications des formes cellulaires, responsables de l'incurvation de la plaque neurale et à l'origine des replis neuraux, et une extension convergente qui rétrécit la plaque neurale et permet la fusion des replis neuraux.
- Les cellules des crêtes neurales quittent la partie dorsale du tube neural et migrent individuellement. Elles forment une gamme variée de tissus différents dans l'ensemble du corps.
- Une migration cellulaire collective permet la formation de la ligne latérale des poissons.
- Des modifications du cytosquelette des cellules épidermiques permettent les fermetures dorsale des embryons de drosophile et ventrale des embryons de *Caenorhabditis* par rapprochement des bords des tissus épi- et hypodermiques.
- La dilatation dirigée, par l'effet de la pression hydrostatique, est responsable de l'élongation finale de la chorde des vertébrés et de l'allongement de l'embryon de nématode.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Donner les quatre types d'interactions adhésives entre cellules et entre cellules et matrice extracellulaire. Quelles sont les protéines transmembranaires caractéristiques de chacune de ces interactions ? Quelles sont les particularités d'une jonction adhérente : quelle molécule d'adhérence intervient, quel constituant cytosquelettique est impliqué, et quel lien existe entre la molécule d'adhérence et le cytosquelette ?

2. Décrire les résultats d'une expérience dans laquelle des cellules de l'épiderme et de la plaque neurale d'une neurula d'amphibien sont dissociées en cellules individuelles et ensuite mélangées. Comment interpréter cette expérience en terme de force d'auto-adhérence dans ces deux tissus ? Comment ce résultat reflète-t-il l'organisation de ces tissus dans l'embryon ?

3. Définir « clivage radiaire ». Au cours de ce type de clivage, comme chez l'oursin, comment sont positionnés les centrosomes par rapport à l'axe animal/végétatif lors de la première division ? Même question pour les deux cycles de divisions suivants.

4. Qu'est-ce que la compaction de l'embryon de souris ? En quoi cette compaction est-elle liée à deux événements importants : la formation du blastocœle et celle de la masse cellulaire interne ?

5. Comparer les propriétés d'un épithélium et d'un mésenchyme. Quelle est l'influence des cadhérines sur la transition de l'un à l'autre ? Comment cette transition est-elle régulée ou déclenchée ? (penser à *snail*).

6. Consulter la carte des territoires présomptifs de l'oursin (Fig. 6.20) et celle du xénope (Fig. 4.9) : chez l'oursin, le mésoderme est au pôle végétatif et l'endoderme est situé entre le mésoderme et l'ectoderme ; chez le xénope, l'endoderme est au pôle végétatif

et le mésoderme est situé entre l'endoderme et l'ectoderme. Est-il possible de préciser les différences de gastrulation entre ces espèces rendant compte de ces localisations ?

7. Comparer épibolie et extension convergente. De quelle manière ces deux processus interviennent-ils au cours de la gastrulation du xénope ?

8. Si des cellules d'un feuillet plat contractent une de leurs faces, la face apicale, le feuillet forme une dépression dans la région concernée. Donner des exemples de la façon dont ce mécanisme est utilisé pour initier la gastrulation chez les oursins, la drosophile et le xénope.

9. Comment des modifications de morphologie et d'adhésivité cellulaires collaborent-elles dans la formation du tube neural ?

10. Décrire la voie de migration des cellules des crêtes neurales qui formeront un ganglion rachidien. Préciser les rôles des Ephs et des éphrines dans cette migration.

11. Quel est le rôle de la dilatation dirigée dans la formation de la chorde ? Quel rôle jouent les glycosaminoglycanes dans ce processus ?

12. Décrire les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation, depuis la première apparition du blastopore jusqu'à celle des replis neuraux, tout d'abord chez le xénope, puis comparer avec le poulet et le poisson-zèbre.

QCM

NB. Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.

1. Les jonctions adhérentes jouent un rôle important au cours du développement. Elles sont constituées de

- a) cadhérines liées à d'autres cadhérines côté extracellulaire et reliés à des filaments d'actine côté intracellulaire
- b) cadhérines liées à d'autres cadhérines côté extracellulaire et reliés aux filaments intermédiaires côté intracellulaire
- c) molécules de la superfamille des immunoglobulines (Ig) liées à d'autres Ig côté extracellulaire et au cytosquelette côté intracellulaire
- d) intégrines liées à des molécules de la matrice extracellulaire côté extracellulaire et au cytosquelette côté intracellulaire

2. Si des embryons sont traités par un traitement chimique ou des protéases et que les cellules isolées ainsi obtenues sont ensuite mélangées en culture, que se passe-t-il ?

- a) Les cellules s'associeront au hasard.
- b) Les cellules s'associeront par type d'origine.
- c) Les cellules se rassembleront et donneront un embryon normal capable de poursuivre son développement.
- d) Les cellules formeront par régulation un ou plusieurs embryons normaux.
- 3. Quel type de clivage est observé chez l'embryon d'amphibien ?
- a) radiaire
- b) spiral
- c) superficiel
- d) inégal dès le stade 2 cellules

4. Comment les cellules de l'endoderme d'oursin forment-elles l'archentéron pendant la gastrulation ?

- a) Des modifications de forme cellulaire initient l'invagination ; une extension convergente étend le feuillet dans le blastocœle et, finalement, des filopodes entrent en contact avec la région de la future bouche et entraînent l'extrémité de l'archentéron vers cette zone.
- b) Elles migrent dans le blastocœle et constituent une baguette solide qui se creuse d'une cavité formant ainsi l'archentéron.
- c) Elles passent dans le blastocœle et forment les structures squelettiques qui soutiendront l'animal adulte.
- d) Elles passent dans le blastocœle sous une forme mésenchymateuse et migrent ventralement jusqu'à la localisation de la future bouche.

5. Au cours de la gastrulation de la grenouille, les toutes premières cellules à pénétrer à l'intérieur de l'embryon par le blastopore sont des cellules superficielles de la zone marginale ; elles deviendront :

- a) de l'ectoderme
- b) de l'endoderme
- c) du mésoderme
- d) du vitellus

6. Chez l'oursin, la drosophile ou le xénope, la gastrulation commence par une modification de morphologie cellulaire, à savoir par la contraction de la face apicale d'une couche cellulaire épithéliale. Le mouvement qui en résulte est appelé

- a) extension convergente
- b) épibolie
- c) invagination
- d) involution

7. Chez le xénope, le mésoderme entre par le blastopore en s'enroulant autour de sa lèvre dorsale selon un processus appelé

- a) extension convergente
- b) épibolie
- c) invagination
- d) involution

8. Chez le xénope, l'extension du mésoderme vers l'avant est réalisée par l'intercalation de cellules au cours d'un processus appelé a) extension convergente

- b) épibolie
- c) invagination
- d) involution

9. Chez le poulet, de quel(s) processus cellulaire(s) dépend la formation du tube neural ?

- a) Seules des modifications d'adhésivité au sein de l'ectoderme entre le tube neural présomptif et l'épiderme présomptif sont nécessaires pour la formation du tube neural.
- b) Des modifications de forme cellulaire au sein de la plaque neurale et des modifications d'expression de molécules d'adhérence dans le tube neural sont nécessaires pendant la formation du tube neural.
- c) Seules des modifications de forme cellulaire au sein de la plaque neurale, sont nécessaires pour la formation du tube neural.
- d) La formation du tube neural est une conséquence passive de l'extension convergente dans la chorde.

10. Les cellules des crêtes neurales empruntant la voie dorso-latérale formeront

- a) la médullo-surrénale
- b) les ganglions rachidiens
- c) les mélanocytes
- d) les ganglions sympathiques

Réponses aux QCM

1 : a, 2 : b, 3 : a, 4 : a, 5 : b, 6 : c, 7 : d, 8 : a, 9 : b, 10 : c.

Références bibliographiques générales

- Alberts, B. *et al.* : *Molecular Biology of the Cell* (5th edn). New York : Garland Science, 2009.
- Aman, A., Piotrowski, T. : **Cell migration during morphogenesis**. *Dev. Biol.* 2010, **341 :** 20–33.
- Engler, A.J., Humbert, P.O., Wehrle-Haller, B., Weaver, V.M. : Multiscale modeling of form and function. *Science* 2009, **324** : 209–212.
- Mattila, P.K., Lappalainen, P. : Filopodia : molecular architecture and cellular functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009, 9 : 446–454.
- Stern, C. *et al.* : *Gastrulation* : *From Cells to Embryos*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004.

Références bibliographiques spécifiques

9.1 La réagrégation de cellules dissociées démontre l'existence d'une adhésivité différentielle entre tissus différents

Davis, G.S., Phillips, H.M., Steinberg, M.S. : Germ-layer surface tensions and 'tissue affinities' in *Rana pipiens* gastrulae : quantitative measurements. *Dev. Biol.* 1997, **192** : 630–644.

Krieg, M., Arboleda-Estudillo, Y., Puech, P.-H., Käfer, J., Graner, F., Müller, D.J., Heisenberg, C.-P. : Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat. Cell Biol.* 2008, 10 : 429–436. Lecuit, T., Lenne, P.-F. : Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8 : 633–644.

Steinberg, M.S. : Differential adhesion in morphogenesis : a modern view. Curr. Opin. Genet. Dev. 2007, 17 : 291–296.

ENCART 9A Molécules d'adhérence cellulaire et jonctions cellulaires

Hynes, R.O : Integrins : bidirectional allosteric signaling mechanisms. *Cell* 2002, **110** : 673–699.

Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., Peifer, M. : Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. Nat Rev. Mol. Cell Biol. 2000, 1: 91–100.

Thiery, J.P. : Cell adhesion in development : a complex signaling network. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003, 13 : 365–371.

9.2 Les cadhérines permettent une adhésivité sélective

Duguay, D., Foty, R.A., Steinberg, M.S. : Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation : qualitative and quantitative determinants. *Dev. Biol.* 2003, 253 : 309–323.

Levine, E., Lee, C.H., Kintner, C., Gumbiner, B.M. : **Selective disruption of E-cadherin function in early** *Xenopus* **embryos by a dominant negative mutant**. *Development* 1994, **120** : 901–909.

Takeichi, M., Nakagawa, S., Aono, S., Usui, T., Uemura, T. : Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 2000, 355 : 995–996.

9.3 La conversion d'un tissu épithélial en tissu mésenchymateux (et *vice versa*) implique des modifications de l'adhérence cellulaire

Ferrer-Vaquer, A., Viotti, M., Hadjantonakis, A.K. : Transitions between epithelial and mesenchymal states and the morphogenesis of the early mouse embryo. *Cell Adh. Migr.* 2010, 4 : 447–457.

Lim, J., Thiery, J.P. : **Epithelial–mesenchymal transitions :** insights from development. *Development* 2012, **139 :** 3471– 3486.

Nakaya, Y., Sheng, G. : **Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation : an embryological view**. *Dev. Growth Differ*. 2008, **50 :** 755–766.

Nieto, M.A. : **The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease**. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011, **27** : 347–376.

Yang, J., Weinberg, R.A. : Epithelial–mesenchymal transition : at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 2008, 14 : 818–829.

9.4 L'orientation du fuseau mitotique détermine l'orientation du plan de division

Glotzer, M. : Cleavage furrow positioning. J. Cell Biol. 2004, 164 : 347–351.

Théry, M., Racine, V., Pépin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.-B., Bornens, M. : **The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis.** *Nat. Cell Biol.* 2005, **7**: 947–953.

9.5 La position du fuseau dans la cellule détermine les tailles relatives des cellules filles

Galli, M., van den Heuvel, S. : Determination of the cleavage plane in early *C. elegans* embryos. *Annu. Rev. Genet.* 2009, 42: 399–411. Gönczy, P., Rose, L.S. :**Asymmetric cell division and axis formation in the embryo**. In *WormBook* (ed. The C. elegans Research Community) (October 15, 2005). doi/10.1995/ wormbook.1.30.1, http://www.wormbook.org (date accessed 4 February 2014).

9.6 La polarité cellulaire apparaît dans la blastula d'amphibien et dans la morula de souris

Pauken, C.M., Capco, D.G. : Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos : roles for PKC and beta-catenin. Mol. Reprod. Dev. 1999, 54 : 135–144.

Sutherland, A.E., Speed, T.P., Calarco, P.G. : Inner cell allocation in the mouse morula : the role of oriented division during fourth cleavage. *Dev. Biol.* 1990, **137** : 13–25.

9.7 Les jonctions serrées et un transport d'ions permettent une accumulation de liquide à l'origine de la formation du blastocœle dans le blastocyste de mammifère

Barcroft, L.C., Offenberg, H., Thomsen, P., Watson, A.J. : Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Dev. Biol.* 2003, **256** : 342–354.

Eckert, J.J., Fleming, T.P. : **Tight junction biogenesis during** early development. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, **1778**: 717–728.

Fleming, T.P., Sheth, B., Fesenko, I. : Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front. Biosci.* 2001, 6 : 1000–1007.

Watson, A.J., Natale, D.R., Barcroft, L.C. : Molecular regulation of blastocyst formation. Anim. Reprod. Sci. 2004, 92–93: 593–592.

9.8 La gastrulation chez l'oursin implique une transition épithélio-mésenchymateuse, des migrations cellulaires et une invagination de la paroi de la blastula

Davidson, L.A., Oster, G.F., Keller, R.E., Koehl, M.A.R. : Measurements of mechanical properties of the blastula wall reveal which hypothesized mechanisms of primary invagination are physically plausible in the sea urchin *Stronglyocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* 1999, **204** : 235–250.

Duloquin, L., Lhomond, G., Gache, C. : Localized VEGF signaling from ectoderm to mesenchyme cells controls morphogenesis of the sea urchin embryo skeleton. *Development* 2007, **134** : 2293–2302.

Ettensohn, C.A. : **Cell movements in the sea urchin embryo**. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999, **9 :** 461–465.

Gustafson, T., Wolpert, L. : Studies on the cellular basis of morphogenesis in the sea urchin embryo. Directed movements of primary mesenchyme cells in normal and vegetalized larvae. *Exp. Cell Res.* 1999, **253** : 299–295.

Mattila, P.K., Lappalainen, P. : Filopodia : molecular architecture and cellular functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009, 9 : 446–454.

Miller, J.R., McClay, D.R. : Changes in the pattern of adherens junction-associated β-catenin accompany morphogenesis in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 1997, **192** : 310–322.

Odell, G.M., Oster, G., Alberch, P., Burnside, B. : The mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination. *Dev. Biol.* 1991, 95 : 446–462.

Raftopoulou, M., Hall, A. : Cell migration : Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 2004, 265 : 23–32.

Röttinger, E., Saudemont, A., Duboc, V., Besnardeau, L., McClay, D., Lepage, T. : FGF signals guide migration of mesenchymal cells, control skeletal morphogenesis and regulate gastrulation during sea urchin development. *Development* 2009, 135 : 353–365.

9.9 L'invagination du mésoderme de la drosophile est provoquée par des modifications de morphologie cellulaire contrôlées par des gènes de polarité dorso-ventrale

Martin, A.C., Kaschube, M., Wieschaus, E.F. : **Pulsed contractions** of an actin–myosin network drives apical contraction. *Nature* 2009, **457** : 495–499.

9.10 L'extension de la bandelette germinative de drosophile implique un remodelage myosine-dépendant des jonctions cellulaires et une intercalation cellulaire

Bertet, C., Sulak, L., Lecuit, T. : **Myosin-dependent junction** remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. Nature 2004, **429** : 667–671.

9.11 La gastrulation des amphibiens et des poissons implique involution, épibolie et extension convergente

Dzamba, B.J., Jakab, K.R., Marsden, M., Schwartz, M.A., DeSimone, D.W. : Cadherin adhesion, tissue tension, and noncanonical Wnt signaling regulate fibronectin matrix organization. *Dev. Cell.* 2009, 16 : 421–432.

Goto, T., Davidson, L., Asashima, M., Keller, R. : Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. *Curr. Biol.* 2005, 15 : 797–793.

Heisenberg, C.P., Solnica-Krezel, L. : Back and forth between cell fate specification and movement during vertebrate gastrulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2008, **18 :** 311–316.

Keller, R. : Cell migration during gastrulation. Curr. Opin. Cell Biol. 2005, 17: 533–541.

Keller, R., Davidson, L.A., Shook, D.R. : **How we are shaped : the biomechanics of gastrulation**. *Differentiation* 2003, **71 :** 171–205.

Montero, J.A., Carvalho, L., Wilsch-Brauninger, M., Kilian, B., Mustafa, C., Heisenberg, C.P. : **Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation**. *Development* 2005, **132** : 1197–1199.

Montero, J.A., Heisenberg, C.P. : Gastrulation dynamics : cells move into focus. *Trends Cell Biol.* 2004, 14 : 620–627.

Ninomiya, H., Elinson, R.P., Winklbauer, R. : Antero-posterior tissue polarity links mesoderm convergent extension to axial patterning. *Nature* 2004, **430** : 364–367.

Ninomiya, H., Winklbauer, R. : Epithelial coating controls mesenchymal shape change through tissue-positioning effects and reduction of surface-minimizing tension. *Nat. Cell Biol.* 2009, 10: 61–69.

Shih, J., Keller, R. : Gastrulation in *Xenopus laevis* : involution—a current view. *Dev. Biol.* 1994, 5 : 95–90.

Wacker, S., Grimm, K., Joos, T., Winklbauer, R. : Development and control of tissue separation at gastrulation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 2000, 224 : 429–439.

ENCART 9C L'extension convergente

Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D., Skoglund, P. : Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Proc R. Soc. Lond. B* 2000, 355 : 997–922. Simons, M., Mlodzik, M. : Planar cell polarity signaling : from fly development to human disease. Annu. Rev. Genet. 2009, 42 : 517–540.

Torban, E., Kor, C., Gros, P. : Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends Genet*. 2004, **20**: 570–577.

Wallingford, J.B., Fraser, S.E., Harland, R.M. : **Convergent** extension : the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev. Cell* 2002, 2 : 695–706.

Zallen, J.A. : **Planar polarity and tissue morphogenesis**. *Cell* 2007, **129 :** 1051–1063.

9.12 Le développement de la chorde chez le xénope illustre la nécessité d'une polarité antéro-postérieure établie pour la mise en place d'une polarité cellulaire médio-latérale

Keller, R., Cooper, M.S., D'Anilchik, M., Tibbetts, P., Wilson, P.A. :
Cell intercalation during notochord development in *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool. 1999, 251 : 134–154.

9.13 La gastrulation de l'embryon de poulet et de souris implique la délamination de cellules de l'épiblaste et leur immigration au niveau de la ligne primitive

Arkell, R.M., Fossat, N., Tam, P.P. : Wnt signalling in mouse gastrulation and anterior development: new players in the pathway and signal output. *Curr Opin Genet Dev.* 2013, 23 : 454–460.

Chuai, M., Hughes, D., Weijer, C.J. : **Collective epithelial and mesenchymal cell migration during gastrulation.** *Curr. Genomics* 2012, **13** : 267–277.

Sun, X., Meyers, E.N., Lewandoski, M., Martin, G.R. : Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev.* 1999, 13 : 1834–46

Voiculescu, O., Bertocchini, F., Wolpert, L., Keller, R.E., Stern, C.D. : The amniote primitive streak is defined by epithelial cell intercalation before gastrulation. *Nature* 2007, 449 : 1049–1052.

Williams, M., Burdsal, C., Periasamy, A., Lewandoski, M., Sutherland, A. : Mouse primitive streak forms in situ by initiation of epithelial to mesenchymal transition without migration of a cell population. *Dev. Dyn.* 2012, 241 : 270–283.

9.14 La formation du tube neural est due à des changements de forme cellulaire et à une extension convergente

Colas, J.F., Schoenwolf, G.C. : Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev. Dyn.* 2001, 221 : 117–145.

Copp, A.J., Greene, N.D.E., Murdoch, J.N. : The genetic basis of mammalian neurulation. Nat. Rev. Genet. 2003, 4: 784–793.

Davidson, L.A., Keller, R.E. : Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development* 1999, **126** : 4547–4556.

Haigo, S.L., Hildebrand, J.D., Harland, R.M., Wallingford, J.B. : Shroom induces apical constriction and is required for hingepoint formation during neural tube closure. *Curr. Biol.* 2003, 13 : 2125–2137.

Ray, H.J., Niswander, L. : Mechanisms of tissue fusion during development. *Development* 2012, **139** : 1701–1711.

Rolo, A., Skoglund, P., Keller, R. : **Morphogenetic movements during neural tube closure in** *Xenopus* **require myosin IIB**. *Dev. Biol.* 2009, **327** : 327–339. Wallingford, J.B., Harland, R.M. : Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. Development 2002, 129 : 5915–5925.

ENCART 9E Les malformations du tube neural

Greene, N.D.E., Stanier, P., Copp, A.J. : Genetics of human neural tube defects. *Hum. Mol. Genet.* 2009, **19** : R113–R129.

Juriloff, D.M., Harris, M.J. : **Mouse models for neural tube closure defects**. *Hum. Mol. Genet.* 2000, **9 :** 993–1000.

Kibar, Z., Capra, V., Gros, P. : Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. *Clin. Genet.* 2007, 71 : 295–310.

Torban, E., Patenaude, A.M., Leclerc, S., Rakowiecki, S., Gauthier, S., Andelfinger, G., Epstein, D.J., Gros, P. : Genetic interaction between members of the Vang1 family causes neural tube defects in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 105 : 3449– 3454.

 Wallingford, J.B., Niswander, L.A., Shaw, G.M., Finnell, R.H. :
 The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science* 2013, 339 : 1222002.

9.15 Les cellules des crêtes neurales se différencient en une large gamme de types cellulaires différents

&

9.16 La migration des cellules des crêtes neurales est contrôlée par des signaux environnementaux

Bronner-Fraser, M. : Mechanisms of neural crest migration. *BioEssays* 1993, **15** : 221–230.

Holder, N., Klein, R. : **Eph receptors and ephrins : effectors of morphogenesis**. *Development* 1999, **126 :** 2033–2044.

Kuan, C.Y., Tannahill, D., Cook, G.M., Keynes, R.J. : Somite polarity and segmental patterning of the peripheral nervous system. *Mech. Dev.* 2004, **121** : 1055–1069.

Kuriyama, S., Mayor, R. : Molecular analysis of neural crest migration. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2009, 363 : 1349–1362.

Nagawa, S., Takeichi, M. : Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* 1999, **125** : 2963–2971.

Poliakoff, A., Cotrina, M., Wilkinson, D.G. : Diverse roles of Eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev. Cell* 2004, **7** : 465–490.

Stark, D.A., Kulesa, P.M. : An *in vivo* comparison of photoactivatable fluorescent proteins in an avian embryo model. *Dev. Dyn.* 2007, 236 : 1583–1594.

Thevenean, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moeppo, B., Parsons, M., Mayor, R. : **Collective chemotaxis**

requires contact-dependent cell polarity. *Dev. Cell* 2010, **19**: 39–53.

Tucker, R.P. : Neural crest cells : a model for invasive behavior. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004, **36** : 173–177.

Xu, Q., Mellitzer, G., Wilkinson, D.G. : Roles of Eph receptors and ephrins in segmental patterning. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 2000, 353 : 993–1002.

9.17 La mise en place de l'ébauche de la ligne latérale des poissons est un exemple de migration cellulaire collective

Friedl, P., Gilmour, D. : Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009, 10: 445–457.

Haas, P., Gilmour, D. : Chemokine signaling mediates selforganizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev. Cell* 2006, **10** : 673–680.

9.18 Les fermetures dorsale chez l'embryon de drosophile et ventrale chez celui de *Caenorhabditis elegans* se réalisent par l'entremise de filopodes

Chin-Sang, I.D., Chisholm, A.D. : Form of the worm : genetics of epidermal morphogenesis in *C. elegans*. *Trends Genet*. 2000, 16 : 544–551.

Jacinto, A., Woolner, S., Martin, P. : **Dynamic analysis of dorsal closure in** *Drosophila*: from genetics to cell biology. *Dev. Cell* 2002, **3**: 9–19.

Millard, T. H., Martin, P. : Dynamic analysis of filopodial interactions during the zippering phase of Drosophila dorsal closure. Development 2008, 135 : 621–626.

Peralta, X.G., Toyama, Y., Hutson, M.S., Montague, R., Venakides, S., Kiehart, D.P., Edwards, G.S.: Upregulation of forces and morphogenic asymmetries in dorsal closure during *Drosophila* development. *Biophys. J.* 2007, 92 : 2583–2596.

Woolner, S., Jacinto, A., Martin, P. : The small GTPase Rac plays multiple roles in epithelial sheet fusion—dynamic studies of *Drosophila* dorsal closure. *Dev. Biol.* 2005, 292 : 163–173.

9.19 L'extension tardive et la rigidification de la chorde sont obtenues par dilatation dirigée

Adams, D.S., Keller, R., Koehl, M.A. : The mechanics of notochord elongation, straightening and stiffening in the embryo of *Xenopus laevis*. *Development* 1990, 110 : 115–130.

9.20 La contraction circonférentielle des cellules hypodermiques allonge l'embryon de nématode

Priess, J.R., Hirsh, D.I. : *Caenorhabditis elegans* morphogenesis : the role of the cytoskeleton in elongation of the embryo. *Dev. Biol.* 1996, **117** : 156–173.

10

Cellules germinales, fécondation et déterminisme du sexe

 Développement des cellules germinales • Fécondation

 Détermination du phénotype sexuel

Les embryons des animaux se développent à partir d'une simple cellule, l'œuf fécondé ou zygote issu de la fusion d'un ovule et d'un spermatozoïde. Dans des chapitres précédents a été vu comment le plan d'organisation de base des embryons est généré par l'évolution des cellules somatiques et leur distribution au sein des trois feuillets embryonnaires. Le zygote est également à l'origine des cellules germinales donnant naissance aux gamètes par lesquels les gènes d'un organisme sont transmis à la génération suivante. Alors que les cellules germinales sont spécifiées et s'individualisent précocement dans l'embryon, les œufs matures et les spermatozoïdes fonctionnels ne sont seulement produits que par l'adulte. Une propriété importante des cellules aerminales est qu'elles sont généralement les seules capables de donner naissance à un nouvel organisme. Cependant, chez les mammifères certains gènes ont été rendus silencieux de manière différentielle selon l'origine paternelle ou maternelle des gamètes par un processus appelé empreinte génétique, et dont les conséquences lors du développement seront examinées ici. De même seront discutés les mécanismes qui permettent, chez l'oursin et les mammifères, à ce qu'un seul spermatozoïde pénètre dans l'ovule. Chez les animaux évoqués dans ce chapitre, le sexe est déterminé par leur constitution chromosomique, et les mécanismes de la détermination du sexe et de la compensation d'une distribution inéqale des chromosomes sexuels entre mâles et femelles, qui diffèrent considérablement entre les espèces, seront décrits.

Chez les organismes se reproduisant de manière sexuée, il existe une distinction fondamentale entre les **cellules de la lignée germinale** (les **cellules germinales**) et les autres cellules corporelles ou somatiques (voir Section 1.2) : les premières sont à l'origine des **gamètes**, ovules et spermatozoïdes, tandis que les secondes ne contribuent pas à la constitution génétique de la nouvelle génération. Les cellules germinales ont trois fonctions clés : la préservation de l'intégrité génétique de la lignée germinale, notamment contre le vieillissement, la génération d'une diversité génétique, et la transmission de l'information génétique à la génération suivante.

Jusqu'à présent dans l'ouvrage, le développement d'organismes modèles a été abordé sous un angle somatique, mais souvent la biologie des organismes se focalise sur la reproduction et le sexe, et dans ce chapitre, seront examinées les questions relatives à la formation des cellules germinales, la fécondation, et la détermination du sexe, principalement chez la souris, la drosophile et *Caenorhabditis elegans*. Comme les cellules germinales sont à l'origine d'une génération nouvelle, leur mise en place et évolution ultérieure est cruciale, et chez les animaux, elles sont habituellement spécifiées et individualisées précocement au cours du développement embryonnaire. Les plantes, bien que se reproduisant de manière sexuée, diffèrent de la plupart des animaux en n'ayant pas leurs cellules sexuelles spécifiées au cours d'un développement embryonnaire précoce mais lors de la floraison (voir Chapitre 7). Il est à noter que certains animaux simples, telle que l'hydre, peuvent se reproduire de manière asexuée, par bourgeonnement, et que même chez quelques vertébrés, tels que certains lézards, les œufs peuvent se développer sans avoir été fécondés.

Dans un premier temps sera considéré comment les cellules germinales sont spécifiées chez le jeune embryon, et comment elles sont à l'origine des gamètes, ovules et spermatozoïdes Puis seront abordées la **fécondation** et l'activation de l'ovule par le spermatozoïde, étape vitale qui initie un développement, et enfin la **détermination du sexe** conduisant à une différenciation entre mâles et femelles. Chez tous les animaux étudiés ici, le sexe est déterminé génétiquement, par la présence et le nombre de chromosomes particuliers, les **chromosomes sexuels**. Les embryons mâles et femelles paraissent initialement semblables, les différences sexuelles n'apparaissant seulement qu'à la suite de l'activité de gènes de déterminants sexuels localisés sur les chromosomes sexuels.

La différenciation des cellules germinales

Chez la plupart des animaux, les cellules de la lignée germinales sont les seules à pouvoir donner naissance à un nouvel organisme. Contrairement aux cellules somatiques qui finiront toutes par mourir, elles peuvent dans un sens survivre aux individus qui les ont formés, ce qui en fait des cellules très particulières. Les cellules germinales produisent soit des gamètes mâles (spermatozoïdes) soit des gamètes femelles (ovules). La cellule œuf est une cellule exceptionnelle car c'est d'elle que dérivent toutes les cellules de l'organisme. Pour les espèces chez lesquelles les embryons ne reçoivent pas d'éléments nutritifs de la mère après la fécondation, l'ovule doit aussi fournir tout ce qui est nécessaire pour le développement puisque le spermatozoïde n'apporte pratiquement rien si ce n'est ses chromosomes.

Typiquement, les cellules germinales diffèrent des cellules somatiques en se divisant moins souvent qu'elles au cours de l'embryogenèse précoce. Plus tard, ce sont les seules cellules à réaliser un type particulier de divisions appelé **méiose**, grâce auquel sont produits des gamètes dont le nombre de chromosomes est la moitié de celui de ses progénitrices et des cellules somatiques. Lorsque deux gamètes fusionnent lors de la fécondation, le nombre diploïde de chromosomes est rétabli dans le zygote. Si la réduction du nombre de chromosomes lors de la méiose n'existait pas, le nombre de chromosomes dans les cellules somatiques doublerait à chaque génération.

Les cellules germinales subissent la méiose dans des organes reproducteurs spécialisés appelés gonades, ovaires chez les femelles et testicules chez les mâles, avant que de devenir des gamètes fonctionnels, ovules ou spermatozoïdes. Mais chez beaucoup d'animaux, dont la drosophile et les vertébrés, les cellules germinales sont primitivement spécifiées dans des régions relativement distantes de celles où se formeront au final les gonades, et elles migrent depuis leur site d'origine vers les gonades en formation. Du moment où elles sont spécifiées en tant que cellules germinales jusqu'à celui où elles pénètrent dans les gonades, les cellules précurseuses germinales sont dénommées cellules germinales primordiales (ou PGC pour Primordial Germ Cell). Chez beaucoup d'animaux, ces dernières sont formées dans des sites qui semblent les protéger de signaux inducteurs déterminant un devenir en cellules somatiques et ces cellules ne s'engagent donc pas dans un programme de développement somatique. Chez Caenorhabditis, par exemple, une répression générale de la transcription est observée dans les cellules germinales primordiales. Dans certaines lignées germinales, d'autres mécanismes existent qui aident à supprimer la survenue de mutations et qui maintiennent l'intégrité génétique. Chez la drosophile, par exemple, le mouvement de transposons dans le génome, cause possible de mutations, est évité par un mécanisme d'extinction génique impliquant des petits ARN interagissant avec la protéine Piwi (piARN).
Les cellules germinales sont spécifiées très tôt chez certains animaux, mais pas chez les mammifères, par des déterminants cytoplasmiques présents dans l'ovule. La question de la spécification des cellules germinales primordiales sera tout d'abord abordée, en considérant le rôle d'un contenu cytoplasmique particulier, le **plasme germinal**, déjà présent dans les ovules.

10.1 Les cellules germinales sont spécifiées chez certains embryons par la présence d'un plasme germinal dans l'ovule

Chez les mouches, les nématodes, les poissons et les grenouilles, des molécules localisées dans une région cytoplasmique particulière de l'ovule sont impliqués dans la spécification des cellules germinales. L'exemple le plus net est celui de la drosophile, où les cellules germinales primordiales s'individualisent en cellules polaires au pôle postérieur de l'embryon, environ 90 minutes après la fécondation, et en avance de plus d'une heure sur la cellularisation du reste de l'embryon (voir Fig. 2.2). Le cytoplasme localisé au pôle postérieur est appelé plasme polaire et se distingue par des inclusions de grande taille, les granules polaires, qui contiennent à la fois des protéines et des ARN. Deux expériences clés ont permis de montrer la particularité de ce cytoplasme postérieur. D'abord, si on soumet l'extrémité postérieure de l'œuf à une irradiation aux ultraviolets qui détruit l'activité du plasme polaire, aucune cellule germinale ne se développe, alors que les cellules somatiques de cette région continuent à se développer. Par ailleurs, si le plasme polaire d'un œuf est transféré dans le pôle antérieur d'un autre embryon, les noyaux entourés par ce cytoplasme sont spécifiés en noyaux de cellules germinales (voir Fig. 10.1). Si ces cellules antérieures contenant du plasme polaire sont transplantées dans la région postérieure d'un troisième embryon, celles-ci se développent en cellules germinales fonctionnelles (voir Fig. 10.1).

Dans le Chapitre 2 a été vu comment les axes principaux de l'œuf de drosophile sont spécifiés par les cellules folliculaires de l'ovaire, et comment les ARNm bicoïd et nanos se distribuent dans l'œuf (voir Section 2.14). De même, le plasme polaire se trouve localisé dans la région postérieure sous l'influence des cellules folliculaires. Au moins huit gènes à effet maternel sont impliqués dans la formation de ce plasme et des mutations de n'importe lequel d'entre eux, conduisent les individus homozygotes concernés à produire des descendants stériles. Ceux-ci sont en effet dépourvus d'un véritable plasme polaire et bien qu'ils puissent se développer normalement, ils sont également dépourvus de cellules germinales et par conséquent stériles. Un de ces huit gènes est oskar, qui joue un rôle central dans l'organisation et la mise en place du plasme polaire. Des gènes impliqués dans la formation de ce dernier, oskar est le seul à avoir ses ARNm localisés au pôle postérieur. Ceux-ci possèdent dans leur région 3' non traduite le signal de leur localisation. La protéine Staufen est nécessaire pour la localisation des ARNm d'oskar et agit en liant ces ARNm au système microtubulaire polarisé selon l'axe antéro-postérieur (voir Section 2.14). Si la région du gène oskar contenant le signal de localisation en 3' est remplacée par celle du signal de localisation en 3' de bicoïd, les mouches transfectées avec cette construction ont leurs ARNm oskar localisés dans l'extrémité antérieure de l'embryon (Fig. 10.2).

Chez le nématode, une lignée germinale s'établit à la fin de la quatrième division de segmentation, et toutes les cellules germinales dériveront du blastomère P_4 (voir Section 6.2). Cette cellule P4 apparaît après trois divisions à partir de la cellule P1. À chacune de ces divisions, l'une des cellules filles produit des cellules somatiques tandis que l'autre se divise en donnant une cellule précurseur somatique et une cellule P. L'ovule contient dans son cytoplasme des granules P qui se distribuent asymétriquement avant la première division de segmentation, et qui ensuite se trouvent confinés dans la lignée des cellules P (Fig. 10.3). L'association entre formation des cellules germinales et granules P a suggéré que ceux-ci pouvaient avoir un rôle dans la spécification des cellules germinales, et il a été montré qu'au moins un de leurs constituants, le produit du gène *pgl-1*, était nécessaire à la différenciation de ces cellules. PGL-1 peut spécifier les cellules germinales en régulant certains aspects du métabolisme des ARNm.

Chez la mouche et le nématode, la répression de la transcription est nécessaire pour spécifier l'identité des cellules germinales. Chez le nématode, le gène *pie-1* est impliqué dans le maintien des propriétés de cellules souches des blastomères P. Il code une



Fig. 10.1 Du plasme polaire transplanté peut induire la formation de cellules germinales chez la drosophile. Du plasme polaire d'un œuf fécondé de génotype R (en rose) est injecté dans l'extrémité antérieure d'un embryon à un stade précoce de la segmentation de génotype | (en jaune). Après la cellularisation, les cellules contenant du plasme polaire, présentes à l'extrémité antérieure de l'embryon J, sont transférées dans l'extrémité postérieure (zone à partir de laquelle les cellules germinales peuvent migrer dans les gonades) d'un autre embryon de génotype V (en vert). La mouche adulte qui se développe à partir de l'embryon V contient des cellules germinales de génotype J aussi bien que de génotype V.



Fig. 10.2 Le gène oskar est impliqué dans la spécification du plasme germinal chez la drosophile. Les ARNm oskar sont localisés à l'extrémité postérieure de l'embryon, alors que ceux de bicoïd le sont à l'extrémité antérieure. Les signaux de localisation des ARNm *bicoïd* et *oskar* se situent dans leur région non traduite en 3'. Par manipulation de l'ADN de la drosophile, le signal de localisation d'oskar peut être remplacé par celui de bicoïd (en haut). Des mouches transgéniques contenant l'ADN modifié produisent des œufs présentant des ARNm oskar à ses deux extrémités (au centre), où à chacune d'elles des cellules germinales se forment, comme le montre la photographie (en bas). Ainsi, oskar seul est suffisant pour initier la spécification des cellules germinales.

Photographie aimablement communiquée par R. Lehmann.



Fig. 10.3 Les granules P et la protéine PIE-1 sont distribués asymétriquement dans les cellules de la lignée germinale au cours de la segmentation de l'embryon de *C. elegans.* Avant la fécondation, les granules P (en violet) sont distribués dans la totalité de l'ovule. Après la fécondation, ceux-ci se retrouvent situés à son extrémité postérieure. Suite à la première division de segmentation, ils sont exclusivement répartis dans la cellule P1 (schéma du haut), et deviennent alors confinés dans la lignée cellulaire P. La protéine PIE-1 est uniquement présente dans les cellules P. Toutes les cellules germinales dérivent de P4 qui se forme à la suite de la quatrième division de segmentation.

protéine nucléaire d'origine maternelle, non contenue dans les granules P. La protéine PIE-1 n'est présente que dans les blastomères de la lignée germinale, et y réprime la transcription des gènes zygotiques avant de disparaître vers le stade 100 cellules. Cette répression générale permet de protéger les cellules germinales des facteurs de transcription qui auraient pu engager leur différenciation en cellules somatiques. En absence d'une transcription zygotique, les ARNm maternels codent les constituants des cellules germinales.

Le xénope et le poisson-zèbre possèdent aussi un plasme germinal particulier. Chez le xénope, après la fécondation, des zones cytoplasmiques dépourvues de vitellus s'agrègent au pôle végétatif riche en vitellus. Quand les blastomères de ce pôle se divisent, ce cytoplasme particulier se distribue asymétriquement et se retrouve seulement dans les cellules filles les plus proches du pôle végétatif, à partir desquelles seront issues les cellules germinales. L'irradiation de cette zone végétative avec des rayons ultraviolets empêche la formation des cellules germinales, laquelle sera restaurée par l'injection d'un cytoplasme végétatif d'un œuf non irradié.

Lors de la gastrulation, le plasme germinal est confiné dans des cellules localisées dans le plancher du blastocœle, parmi celles à l'origine de l'endoderme. Ces cellules



non encore déterminées en tant que cellules germinales, peuvent contribuer à la formation des trois feuillets embryonnaires si elles sont transplantées dans d'autres sites. À la fin de la gastrulation, les cellules germinales primordiales sont déterminées et quittent l'endoderme présomptif pour coloniser, après migration, les **crêtes génitales** qui se développent au niveau du mésoderme bordant la cavité abdominale et qui formeront les gonades. Il y a, cependant, d'assez grandes différences quant à l'origine des cellules germinales selon les différents groupes d'amphibiens. Chez les Urodèles, tels les salamandres et les tritons, la présence d'un plasme germinal n'a pas été prouvée, et les cellules germinales ont pour origine le mésoderme des lames latérales. La signification évolutive de cette différence reste inconnue.

Chez le poisson-zèbre, le plasme germinal contenant un certain nombre d'ARNm maternels est présent à divers endroits dans l'œuf fécondé et se localise ensuite aux extrémités distales des sillons de divisions lors des premières segmentations. Son devenir peut être observé durant le développement précoce par le suivi d'un de ses constituants, l'ARNm maternel *vasa* (Fig. 10.4). Au stade 32 cellules, le plasme germinal est présent dans quatre blastomères. À chacune des divisions asymétriques suivantes, le plasme germinal est redistribué dans une des cellules filles, de sorte que même au stade 512 cellules, il n'y a encore que quatre cellules germinales présomptives dans l'embryon. Environ 3,8 heures après la fécondation, le plasme germinal se répand dans les cellules, et des divisions égales se produisent donnant au final un nombre total d'environ 30 cellules germinales primordiales, qui migreront dans les futurs ovaires et testicules.

10.2 Chez les mammifères, les cellules germinales sont induites par des interactions intercellulaires au cours du développement

Il n'existe pas de preuve d'une existence d'un plasme germinal chez le poulet, la souris ou d'autres mammifères. Bien qu'observée dans plusieurs organismes modèles du développement, la présence d'un plasme germinal représente une cause relativement peu fréquente de spécification de la lignée germinale. Celle-ci chez la souris fait intervenir des interactions cellulaires, des cellules souches embryonnaires cultivées pouvant, injectées dans la masse cellulaire interne, donner à la fois des cellules germinales et des cellules somatiques (voir Fig. 3.10). Les cellules germinales de mammifères étaient auparavant identifiées principalement grâce à leur concentration élevée en phosphatase alcaline, ce qui donnait un moyen aisé de les détecter par des moyens histochimiques. Maintenant que des gènes impliqués dans leur spécification ont été identifiés, il est possible de mettre en évidence les cellules germinales primordiales à un stade beaucoup plus précoce en détectant l'expression de ces gènes.

C'est dans l'épiblaste proximal, juste avant que ne débute la gastrulation, que les cellules germinales primordiales peuvent être détectées le plus tôt chez la souris. Elles sont spécifiées par une signalisation BMP provenant des tissus extra-embryonnaires voisins et elles forment un amas de six à huit cellules exprimant le gène *Blimp1* qui code un régulateur transcriptionnel. Ces cellules sont observées en premier au stade E6,25, dans une région du futur mésoderme extra-embryonnaire qui sera après des mouvements cellulaires, contiguë à la ligne primitive dont débute la mise en place (Fig. 10.5). Les cellules exprimant *Blimp1* prolifèrent et, à E.7,5, le nombre de cellules

Fig. 10.4 Distribution du plasme germinal chez l'embryon du poisson-zèbre durant la segmentation. L'ARNm vasa maternel, un marqueur du plasme germinal, est représenté en bleu, dans cette vue de dessus du pôle animal de l'œuf. Les ARNm vasa commencent à se localiser dans les sillons de clivage des deux premières divisions. Tandis qu'un sillon achève une division, les ARNm vasa forment des amas serrés à ses extrémités distales, au niveau ou juste en dehors des limites cellulaires, mais sous la membrane cellulaire vitelline. Au stade 32 cellules, les agrégats pénètrent dans quatre cellules, et se ségrégent asymétriquement au cours des divisions successives, pour se localiser au final dans quatre cellules très écartées l'une de l'autre au stade 512 cellules. Au stade sphérique (13e cycle de division de la segmentation), les ARNm vasa se répartissent de manière égale entre les quatre cellules, et les divisions cellulaires qui suivent produisent un total d'environ 30 cellules germinales primordiales réparties entre les quatre sites.

D'après Pelegri, F : Maternel factors in zebrafish development. Dev. Dyn. 2003, 228 : 535-554.



Fig. 10.5 Formation des cellules

germinales chez la souris. À gauche : un petit nombre de cellules germinales primordiales (PGCs pour *Primordial Germ Cells*) (en blanc) exprimant *Blimp1* sont au départ détectées dans l'épiblaste proximal, 6,25 jours après la fécondation (E6,5). Au centre : durant la gastrulation, ces cellules ainsi que les cellules du mésoderme extraembryonnaire présomptif qui les entourent se déplacent jusqu'à l'extrémité postérieure de l'embryon au-dessus de la ligne primitive. À E7,25, environ 40 PGCs (en orange) sont présentes au niveau de la ligne primitive. À droite : vers E8,5, les PGCs débutent leur migration vers les gonades.

D'après Hogan, B. : **Decisions, decisions**. Nature 2002, **418** : 282, et Saitou, M., et al. : **A molecular program for the specification** of germ cell fate in mice. Nature, 2002, **418** : 293-300. germinales primordiales situées dans la ligne primitive est d'environ 40, nombre final de cellules qui migreront vers les gonades (Fig. 10.5, troisième vignette). Blimp1 et deux autres facteurs de transcription également produits dans les cellules primordiales, agissent ensemble pour réprimer l'expression des gènes somatiques et activer les gènes spécifiques des cellules germinales.

À ce stade, l'expression des gènes Hox et d'autres gènes typiques du développement somatique est réprimée dans les cellules germinales primordiales, pouvant expliquer pourquoi elles ne deviennent pas des cellules somatiques. En effet, les cellules germinales primordiales expriment d'une part, des gènes comme *nanog* qui code un facteur de transcription associé au maintien de la pluripotentialité des cellules souches (voir Section 8.14), et d'autre part un grand nombre de gènes impliqués dans l'adhérence et la migration cellulaires. Le moment où apparaissent les cellules germinales chez l'espèce humaine reste inconnu, mais une migration de celles-ci a été observée lors de la quatrième semaine du développement.

10.3 Les cellules germinales migrent depuis leur site d'origine jusqu'aux gonades

Chez beaucoup d'espèces, les cellules germinales primordiales se forment et se divisent hors des gonades, et ce n'est que tardivement qu'elles migrent jusqu'à celles-ci, où elles deviendront les futurs gamètes mâles et femelles. La raison de cette différence entre leurs sites d'origine et de destination finale n'est pas connue, mais il peut exister des mécanismes pour exclure les cellules germinales des perturbations causées par la mise en place du plan corporel, ou pour sélectionner les cellules germinales les plus saines, c'est-à-dire celles qui survivent à la migration. La voie de migration des cellules germinales primordiales est contrôlée par leur environnement, et chez le xénope, par exemple, des cellules germinales primordiales transplantées à un mauvais endroit dans la blastula ne parviennent pas aux gonades.

Les gonades des vertébrés se forment à partir du mésoderme bordant la cavité abdominale, dans la zone dite des crêtes génitales. Chez le xénope, les cellules germinales primordiales issues du plancher du blastocœle effectuent leur migration le long du mésentère qui joint l'intestin aux crêtes génitales. Seul un petit nombre de cellules entreprend ce trajet, et après environ trois divisions, c'est une trentaine de cellules qui colonisent les gonades, nombre proche de cellules situées à l'extrémité postérieure de la ligne primitive (voir Fig. 10.5), ce sont environ 8 000 cellules germinales primordiales qui parviennent aux crêtes génitales après avoir pénétré dans l'endoderme de l'intestin postérieur, puis migré vers le mésentère dorsal et l'avoir traversé (Fig. 10.6).

Chez les embryons de poulet, la migration s'effectue différemment : les cellules germinales ayant pour origine l'épiblaste migrent ensuite vers l'extrémité céphalique de l'embryon. La plupart arrivent à destination par la circulation sanguine, en quittant le flux sanguin au niveau de l'intestin postérieur et avoir migré ensuite le long du mésentère dorsal jusqu'aux gonades.

Chez le poisson-zèbre, des petits amas de cellules germinales primordiales sont spécifiés en quatre lieux séparés par rapport à l'axe embryonnaire (voir Fig. 10.4). Ces cellules migrent pour former dans le tronc, des lignes bilatérales au niveau des somites 1-3, 6 heures environ après la fécondation, puis atteignent vers 12 heures leur position finale au niveau des somites 8-10, où, elles et les cellules somatiques qui les entourent, forment les gonades (Fig. 10.7). C'est un véritable défi auquel sont confrontées ces cellules germinales quant à leur parcours, en étant originaires de quatre sites différents, et ce n'est peut-être pas une coïncidence que ce trajet semble fractionné en stades distincts. Ceci suppose aussi que des cellules germinales prises à la limite d'une mi-blastula peuvent encore trouver leur route vers la gonade après avoir été transplantées dans la région céphalique (le pôle animal) d'un embryon de stade similaire.

10.4 Les cellules germinales sont guidées vers leur destination finale par des signaux chimiques

Toutes les cellules germinales migrantes reçoivent en continu des signaux pour assurer leur guidage, survie et prolifération dans les tissus qu'elles traversent au cours de leur migration. Certains de ces signaux ont été identifiés. S'ils viennent à manquer, les cellules germinales sont absentes des gonades ou en nombre très limité. Le signal principal de guidage à la fois chez le poisson-zèbre et la souris, semble être la protéine chimioat-tractive SDF1 (pour *Stromal-cell Derived Factor 1*), déjà citée à propos de la migration collective de cellules donnant naissance à la ligne latérale chez le poisson-zèbre (voir Section 9.17). SDF1, sécrétée dans la matrice extracellulaire par les cellules des régions que les cellules germinales du poisson-zèbre traversent lors de leur migration, est considéré comme le signal permettant le guidage sur de longues distances des groupes de cellules germinales primordiales issues de points de départ différents pour atteindre leur destination finale (voir Fig. 10.7). Ainsi, des modifications de l'expression spatiale du gène de SDF1, changent les profils migratoires des cellules germinales, et l'emploi d'ARN anti-sens empêchant la production de SDF1 ou de son récepteur CXCR4, présent à la surface des cellules germinales, supprime la migration de ces dernières.

Chez la souris, les cellules germinales primordiales au niveau de la ligne primitive migrent antérieurement et s'incorporent dans l'endoderme de l'intestin postérieur, qu'elles quittent ensuite pour rejoindre les crêtes génitales (voir Fig. 10.6). SDF1 de la souris semble agir comme un signal guidant au moins la partie terminale du trajet migratoire car chez les animaux ne produisant pas SDF1 ou CXCR4, la plupart des cellules germinales restent au niveau de l'intestin postérieur. Ces deux molécules ne concernent pas seulement les embryons, étant également produites dans certains



Fig. 10.6 Voie de migration des cellules germinales primordiales chez l'embryon de souris. En phase finale de leur migration, les cellules passent du tube digestif aux crêtes génitales *via* le mésentère dorsal.

Illustration d'après Wylie, C.C., Heasman, J. : **Migration, proliferation and potency of primordial germ cells**. Semin. Dev. Biol. 1993, **4 :** 161-170.



Fig. 10.7 Chez le poisson-zèbre, les cellules germinales primordiales migrent vers les gonades en deux étapes. Les schémas montrent l'embryon en vue dorsale. Le chimioattractant SDF1 (en jaune) est initialement exprimé dans un large domaine qui contient les sites où les cellules germinales primordiales (PGCs, en bleu) sont formées (voir Fig. 10.4). Celles-ci migrent en direction de la région où la teneur en SDF1 est la plus élevée, qui se situe initialement au niveau du premier somite. Des modifications du patron d'expression de *SDF1* font que les PGCs migrent postérieurement au niveau des 8e et 10e somites, là où les gonades se développent.

D'après Weidinger, G., et al. : **Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target**. Development, 2002, **129 :** 25-36.



cancers humains où elles contribuent à la capacité qu'ont les cellules tumorales à se disséminer dans diverses régions corporelles.

Chez la drosophile, les cellules germinales primordiales qui se forment près de l'intestin postérieur sont, durant la gastrulation, déplacées le long du côté dorsal de l'embryon avec l'ébauche de l'intestin moyen. Elles traversent ensuite l'épithélium dorsal de ce dernier en direction du mésoderme adjacent où elles rejoignent les précurseurs des cellules gonadiques. Un criblage génétique a permis d'isoler des mutations qui affectent la direction migratoire des cellules germinales et d'identifier ainsi des gènes qui codent des protéines permettant aux cellules de rester sur la bonne voie. Deux protéines apparentées, Wunen (WUN) et WUN2, sont impliquées dans la mise à l'écart des cellules germinales du restant de l'intestin, évitant ainsi qu'elles ne se dispersent avant qu'elles n'atteignent le mésoderme gonadique, cependant que l'expression de l'enzyme HMGCoA réductase dans la future gonade est nécessaire pour attirer les cellules germinales. Cette enzyme est impliquée dans la régulation de la production d'un chimioattractant, peut-être Hedgehog, qui est aussi produit par la future gonade, même si cette molécule est plus connue comme molécule signal fournissant des informations de position (voir Chapitre 2).

10.5 La différenciation des cellules germinales implique une réduction de moitié du nombre de chromosomes par la méiose

Les gamètes mâles et femelles sont **haploïdes**, c'est-à-dire qu'ils ne contiennent qu'une copie de chaque chromosome contrairement aux cellules somatiques qui en possèdent deux copies et sont **diploïdes**. La fécondation permet de rétablir le nombre diploïde de chromosomes. Les cellules germinales primordiales évoquées dans les sections précédentes sont diploïdes, et le passage des cellules germinales à l'état haploïde s'effectuant lors de la méiose, celle-ci ne se produira pas tant que les cellules seront hors des gonades (Fig. 10.8). La méiose comporte deux divisions, mais les chromosomes ne sont répliqués qu'une seule fois, avant la première division, ce qui fait que leur nombre se réduit de moitié. Les divisions cellulaires de méiose peuvent être inégales et être à l'origine une petite entité cellulaire appelée **globule polaire** (Encart 10A).

Au cours de la prophase de la première division de méiose, les chromosomes homologues répliqués s'assemblent par paires et sont l'objet d'une **recombinaison** par laquelle des séquences correspondantes d'ADN sont échangées entre les homologues (voir Fig. 10.8). Ceux-ci comportent généralement pour beaucoup de leurs gènes, des versions différentes ou allèles, et de ce fait la recombinaison méiotique génère des chromosomes avec de nouvelles combinaisons d'allèles. Ainsi la méiose produit des gamètes dont les chromosomes portent des combinaisons allèliques différentes de celles des parents, et l'individu qui se développera suite à la fusion des gamètes lors de la fécondation, aura une constitution génétique différente de celle de ses parents. Aussi, peut-on ressembler à ses parents, mais jamais être exactement identique à eux. Ainsi la recombinaison méiotique est-elle la source principale de la diversité génétique chez tous les organismes se reproduisant sexuellement.

Le déroulement de la différenciation des cellules germinales s'effectue différemment suivant le sexe de l'embryon, même si dans tous les cas une méiose est impliquée. L'ensemble des transformations subi par les cellules germinales femelles correspond à l'**ovogenèse** et les principales étapes de celle-ci, chez les mammifères,

Fig. 10.8 La méiose produit des cellules haploïdes. La méiose réduit le nombre de chromosomes le faisant passer d'un état diploïde à haploïde. Pour simplifier, une seule paire de chromosomes est représentée ici. Avant la première division de méiose, l'ADN est répliqué et chaque chromosome est alors constitué de deux chromatides identiques. Les chromosomes homologues appariés (désignés sous le terme de bivalents) présentent des *crossing-over* et des recombinaisons, et s'alignent sur le fuseau de division lors de la métaphase de la première division de méiose. Les chromosomes homologues se séparent, et chacun d'eux se retrouve dans l'une des deux cellules filles issues de cette première division méiotique. L'ADN ne se réplique pas avant la seconde division de méiose. Les chromosomes se séparent et se ségrègent au cours de cette seconde division. Le nombre de chromosomes dans les cellules filles issues de cette dernière est ainsi réduit de moitié.

ENCART 10A Globules polaires

Les globules polaires sont des petites cellules formées lors de la méiose au cours de l'ovogenèse. Dans l'illustration très schématique de la Figure 1, par souci de simplification, la ségrégation d'une seule paire de chromosomes est représentée. La méiose comporte deux divisions où au cours de chacune d'elles, se forme presque toujours une cellule fille de taille très réduite comparée à l'autre. Cette dernière deviendra la cellule œuf, et les plus petites cellules sont désignées sous le terme de globules polaires.



Le déroulement de la méiose en lien avec le développement de l'ovocyte varie selon

les animaux, et chez certaines espèces, la méiose se termine et le second globule polaire se forme seulement après la fécondation (Figure 1). En général, la formation d'un globule polaire a peu d'incidence sur le développement futur, mais chez certains animaux, son site de formation est un marqueur utile pour indiquer les futurs axes embryonnaires.

sont montrées dans la Fig. 10.9 (vignette gauche). Chez ces derniers, les cellules germinales, à l'état diploïde, réalisent un petit nombre de divisions mitotiques durant leur migration vers les gonades ainsi que durant un court moment dans l'ovaire où elles sont alors appelées des **ovogonies**. Après une phase de croissance et une entrée en méiose, les cellules deviennent des **ovocytes primaires**. Dans l'ovaire, chaque ovocyte est individuellement entouré par une enveloppe de cellules somatiques ovariennes, l'ensemble formant un **follicule**. Les ovocytes primaires entrés en méiose chez l'embryon s'arrêtent en prophase de la première division de méiose, stade durant lequel les chromosomes s'apparient et la recombinaison se produit (voir Fig. 10.8). Cet arrêt dépend d'un taux élevé d'AMP cyclique dans l'ovocyte, généré à la suite de signaux provenant de récepteurs couplés à une protéine G. La première division de méiose ne s'achèvera qu'avec l'ovulation chez l'adulte, et la seconde division méiotique qu'avec la fécondation.

Les ovocytes ne proliférant plus après leur entrée en méiose, leur nombre est à ce stade embryonnaire généralement considéré comme étant le nombre maximum de gamètes qu'une femelle mammifère peut produire. Chez l'espèce humaine, la plupart des ovocytes dégénèrent avant la puberté n'en laissant, pour la durée de la vie, que 400 000 sur les 6 à 7 millions au départ. Ce nombre décline avec l'âge et ce déclin s'accélère de la mi-trentaine jusqu'à la ménopause au cours de la cinquantaine (Fig. 10.10). Chez les mammifères et beaucoup d'autres vertébrés, l'ovogenèse reste en suspens après la naissance, durant des mois (souris) ou des années (espèce humaine). Quand la femelle devient sexuellement mature, suite à des stimuli hormonaux, les ovocytes continuent leur évolution se traduisant par une augmentation de leur taille, jusqu'à 10 fois chez les mammifères et beaucoup plus chez certaines espèces comme les grenouilles. Chez quelques vertébrés, tels les grenouilles et les poissons, un grand nombre d'ovocytes deviennent matures et sont libérés simultanément, à la fin de chaque cycle de reproduction. Chez les mammifères, seul un nombre relativement faible d'ovocytes entrent en maturation pendant chaque cycle et sont libérés sous l'influence de l'hormone lutéinisante. La méiose reprend au moment de l'ovulation, avec l'émission d'un globule polaire, et se poursuit jusqu'au stade de la métaphase de la seconde division de méiose. Là, la méiose s'arrête de nouveau et ne s'achèvera qu'après la fécondation, avec l'émission du second globule polaire. Selon les espèces, la fécondation a lieu à des stades différents de l'ovogenèse (voir Encart 10A).

Fig. 10.9 Ovogenèse et spermatogenèse chez les mammifères. À gauche : après

leur entrée dans l'ovaire embryonnaire, les cellules germinales se divisent par mitose un petit nombre de fois et ensuite elles entrent en prophase de la première division de méiose, devenant ainsi des ovocytes. Aucune autre multiplication cellulaire ne se produit. Chez la femelle adulte sexuellement mature se produit un accroissement en masse de 10 fois (non montré ici), la formation d'enveloppes externes et la mise en place d'une couche de granules corticaux localisée sous la membrane plasmique ovocytaire. À chaque cycle reproductif, un groupe de follicules commence à croître, s'accompagnant d'une croissance et maturation ovocytaire ; seuls quelques ovocytes sont libérés par l'ovaire (ovulation), la plupart dégénérant. Les ovocytes poursuivent leur maturation dans l'ovaire sous des influences hormonales, mais après l'ovulation, ils sont bloqués en métaphase de seconde division de méiose, division qui ne s'achèvera que lors de la fécondation. Des globules polaires sont formés lors de la méiose (voir Encart 10A). À droite : les cellules germinales pénètrent dans les testicules embryonnaires et se bloquent au stade G1 du cycle cellulaire. Après la naissance, elles commencent à se diviser de nouveau, formant une population de cellules souches, des spermatogonies. Celles-ci entrent en méiose et deviennent des spermatocytes qui produiront, à l'achèvement de cette dernière, des cellules filles se différenciant en spermatozoïdes dont la production sera continue.





Au cours de la méiose ovocytaire humaine, une non-disjonction accidentelle des chromosomes homologues 21 lors de la première division de méiose peut entraîner la présence d'un chromosome 21 surnuméraire dans l'ovocyte, constituant une trisomie 21. Celle-ci est responsable du syndrome de Down et est l'une des plus communes causes génétiques de malformations congénitales et de difficultés d'apprentissage. Ce type d'erreurs de ségrégation des chromosomes est relativement courant dans les œufs humains, beaucoup plus que dans les spermatozoïdes, et augmente fortement avec l'âge des ovocytes. La majorité des embryons humains avec trop ou pas assez de chromosomes ne sont pas viables à cause d'un déséquilibre dans l'expression d'un grand nombre de gènes. Leur développement s'arrête au stade préimplantatoire ou ils ne peuvent pas s'implanter ou un avortement spontané se produit. Des anomalies chromosomiques telles que celle du syndrome de Down peuvent être détectées à un stade prénatal par des techniques comme l'amniocentèse (voir Section 3.6) ou par prélèvement de villosités chorioniques. Ces techniques invasives qui peuvent entraîner des fausses couches ne sont utilisées que si la probabilité d'un syndrome de Down est élevée, des tests sanguins de routine chez la mère leur étant préférés, mais seul un échantillonnage direct des cellules fœtales permet une confirmation.

La spermatogenèse, c'est-à-dire la production des spermatozoïdes, se déroule très différemment de l'ovogenèse. Les cellules germinales diploïdes à l'origine des spermatozoïdes n'entrent pas en méiose chez l'embryon, mais vont s'arrêter à un stade précoce du cycle cellulaire mitotique dans les testicules embryonnaires, et ne proliféreront qu'après la naissance. Plus tard, chez l'individu mûr sexuellement, les spermatogonies, entrent en méiose, devenant ainsi des spermatocytes primaires, chacun d'eux produisant quatre spermatides haploïdes qui se différencieront en spermatozoïdes (voir Fig. 10.9, vignette droite). À la différence de ce qui s'observe chez la femelle des mammifères dont le nombre d'ovocytes est fixé, les spermatozoïdes continuent à être produits tout au long de la vie d'un individu mâle.

Chez la drosophile, il y a une production continue d'ovules et de spermatozoïdes à partir d'une population de cellules souches. L'ovogenèse commence avec la division d'une cellule souche (voir Fig. 2.16) et ainsi il n'y a pas de limitation intrinsèque au nombre d'œufs qu'une mouche femelle peut produire.

10.6 Le développement d'un ovocyte peut impliquer une amplification génique et des apports de la part d'autres cellules

Les ovules ont des tailles considérablement variables selon les espèces, mais ils sont toujours plus volumineux que les cellules somatiques. Leur diamètre est d'environ 0,1 mm chez un mammifère typique, 1 mm chez une grenouille, et 3 cm chez la poule (c'est-à-dire le jaune, le blanc de l'œuf étant du matériel extracellulaire) (voir Fig. 3.13). Pour atteindre d'aussi grandes tailles, divers mécanismes interviennent, certains organismes en utilisant plusieurs. Une des stratégies est d'accroître le nombre total de copies des gènes dans l'ovocyte, ce qui augmente proportionnellement la quantité d'ARNm pouvant être transcrit, et ainsi la quantité de protéine synthétisée. Les ovocytes primaires de vertébrés, par exemple, sont stoppés en prophase de la première division de méiose doublant ainsi le nombre normal diploïde de gènes alors que transcription et croissance ovocytaire se poursuivent.

Les insectes et les amphibiens produisent beaucoup de copies supplémentaires de gènes dont les produits sont nécessaires en très grandes quantités dans l'œuf. Durant le développement de l'ovocyte d'amphibien, les gènes d'ARNr sont amplifiés, le nombre de copies passant de plusieurs centaines à des millions, ce qui permet d'assurer un nombre suffisant de ribosomes pour la synthèse des protéines au cours de la croissance de l'ovocyte et du développement embryonnaire précoce. Chez les insectes, les gènes qui codent les protéines du chorion, une des enveloppes protectrices du futur embryon, sont amplifiés dans les cellules folliculaires qui l'élaborent et qui entourent l'ovocyte.

Compter sur les activités synthétiques des autres cellules constitue une autre stratégie pour l'ovocyte. Chez les insectes, les cellules nourricières, voisines de l'ovocyte, produisent beaucoup d'ARNm et de protéines et les exportent vers l'ovocyte (voir Fig. 2.16). Chez les oiseaux et les amphibiens, les protéines vitellines sont produites par le foie et transportées par voie sanguine jusqu'à l'ovaire où elles pénètrent par endocytose dans les ovocytes et s'y accumulent sous forme de plaquettes vitellines.



Fig. 10.10 Déclin du nombre d'ovocytes en fonction de l'âge. Le graphe montre les changements du nombre d'ovocytes au sein d'un ovaire humain en fonction de l'âge, avec un maximum d'environ 6-7 millions, lors du développement fœtal précoce, puis une décroissance due à des morts cellulaires par apoptose. À la puberté subsistent environ 400 000 ovocytes et seul un très petit nombre d'entre eux, entre 400 et 500, sont libérés au cours de la vie de la femme. Chez les amphibiens, celles-ci se retrouvent au pôle végétatif de l'ovocyte dont la polarisation est très précoce. Les protéines vitellines sont élaborées par les cellules intestinales chez *C. elegans* et dans les corps gras chez la drosophile. Chez les espèces dont le développement précoce dépend de déterminants maternels sous la forme d'ARNm, ceux-ci sont transférés dans les ovocytes puis localisés dans une zone spécifique suite à un transport microtubulaire.

10.7 Des facteurs cytoplasmiques sont responsables du maintien des potentialités ovocytaires

Telles les autres cellules du corps, les gamètes matures sont des cellules spécialisées ayant suivi un programme de différenciation. Comme cela fut envisagé en détail dans le Chapitre 8, une différenciation cellulaire n'implique pas, sauf dans de rares cas, un quelconque changement de la séquence ou de la quantité de l'ADN, mais plutôt des modifications **épigénétiques**. Ce sont des modifications chimiques de l'ADN et des protéines chromosomiques qui lui sont associées qui changent localement la structure des chromosomes, entraînant sélectivement l'extinction ou non de certains gènes. Quelques types de cellules somatiques, comme les cellules musculaires et nerveuses, ne se divisent plus une fois leur différenciation achevée. Chez les cellules qui conservent la capacité de se diviser, tels les hépatocytes ou les fibroblastes, les modifications épigénétiques qu'elles possèdent sont transmises aux cellules filles, et celles-ci seront de ce fait, respectivement, des hépatocytes et des fibroblastes. Une fois que la différenciation est en cours, aucune de ces cellules somatiques ne peut donner, dans des circonstances normales, un type de cellule totalement différent, et encore moins l'ensemble des types cellulaires nécessaires à la formation d'un nouvel organisme.

Contrairement aux cellules somatiques différenciées, les gamètes matures doivent conserver des potentialités intactes permettant qu'après la fécondation, la combinaison des génomes gamétiques puisse diriger le développement d'un individu complet. Dans les ovules, des facteurs cytoplasmiques sont responsables du maintien des potentialités du génome. Ceci est démontré de façon très spectaculaire par la capacité qu'a un cytoplasme d'un ovule de « reprogrammer » le noyau d'une cellule somatique différenciée de telle sorte qu'il retourne à un état totipotent capable de diriger le développement d'un nouvel organisme. Ceci constitue la base du clonage animal par transfert d'un noyau de cellule somatique, qui a été réalisé chez les amphibiens et quelques espèces de mammifères, dont la souris, et qui est décrit dans le Chapitre 8.

10.8 Chez les mammifères certains gènes contrôlant la croissance embryonnaire sont sous « empreinte »

Le clonage de mammifères s'est avéré être beaucoup plus difficile à réaliser que pour d'autres animaux, et ceci est probablement dû au phénomène de **l'empreinte génomique**, par lequel certains gènes sont éteints soit dans l'ovule soit dans les spermatozoïdes durant leur formation et restent silencieux dans le génome du jeune embryon. La mise en évidence de l'empreinte chez les mammifères est venue initia-lement de la démonstration que les génomes maternel et paternel intervenaient de manière différente lors du développement embryonnaire.

Des transplantations nucléaires peuvent permettre de produire des œufs fécondés dont le génome est uniquement d'origine paternelle ou maternelle et qui peuvent être implantés chez une souris porteuse afin de suivre leur développement. Les embryons qui se développent sont dits respectivement des **androgénotes** et des **gynogénotes**. Bien que les deux types d'embryons aient un nombre diploïde de chromosomes, leur développement est anormal. Les embryons ayant uniquement des chromosomes paternels ont des tissus extra-embryonnaires bien développés, mais l'embryon est anormal, son développement n'allant pas au-delà d'un stade où plusieurs somites sont présents. En revanche, les embryons ne possédant que des chromosomes maternels se développent relativement bien, mais les tissus extra-embryonnaires, placenta et vésicule vitelline, sont peu développés (Fig. 10.11). Ces résultats montrent clairement que la présence conjuguée de chromosomes d'origine maternelle et paternelle, ayant des apports différents, est requise pour que se développent normalement un embryon et un placenta chez les mammifères. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle ces derniers ne peuvent pas se reproduire naturellement par **parthénogenèse**, suite à l'activation d'un œuf non fécondé.



De telles observations ont suggéré qu'au cours de la différenciation des cellules germinales les génomes paternel et maternel devaient être épigénétiquement modifiés. Ces deux génomes contiennent le même lot de gènes, mais le processus d'empreinte allume ou éteint certains gènes soit dans le spermatozoïde soit dans l'ovocyte, entraînant ou non leur expression durant le développement. L'empreinte implique que les gènes affectés gardent une « mémoire » de leur origine à partir d'un spermatozoïde ou d'un ovule.

L'empreinte est un processus réversible et ceci est important, car les gènes soumis à une empreinte peuvent se retrouver chez l'individu de nouvelle génération dans une de ses cellules germinales, mâle ou femelle. L'empreinte transmise disparaît probablement durant la formation précoce des cellules germinales, et est rétablie plus tard au cours de leur différenciation (Fig. 10.12). Quand des mammifères sont clonés en utilisant des noyaux donneurs de cellules somatiques différenciées, ceux-ci ne sont pas repassés par une reprogrammation et donc par le processus d'empreinte s'effectuant normalement lors de la formation des cellules germinales, et ceci pourrait rendre compte du grand nombre d'échecs et d'anomalies constatés à propos des embryons clonés. Fig. 10.11 La présence de chromosomes maternels et paternels est nécessaire pour un développement normal chez la souris. Un embryon normal biparental possède les chromosomes paternels et maternels présents dans les pronuclei lors de la fécondation (à gauche). Par transplantation nucléaire, un œuf fécondé peut être amené à contenir un génome uniquement d'origine paternelle ou maternelle. Les embryons qui se développent à partir d'un zygote ne possédant que des chromosomes maternels, des embryons gynogénotes (au centre), ont des structures extra-embryonnaires peu développées qui provoquent un arrêt du développement, bien que l'embryon soit relativement normal. Les embryons issus d'œufs ne possédant que des chromosomes paternels, des embryons androgénotes (à droite), ont des structures extraembryonnaires normales, mais l'embryon ne se développe que jusqu'à un stade où seuls quelques somites sont formés.



Fig. 10.12 Mise en place, maintien et effacement des empreintes génomiques au cours du cycle vital de la souris.

Les empreintes s'effectuent de manière spécifique en fonction du sexe dans les cellules germinales matures (en vert pâle) avec les empreintes mâles (illustrées pour un unique chromosome en marron, à des fins de clarté) s'établissant en période prénatale et les femelles (chromosome en rouge) en période post-natale. Les empreintes sont conservées dans l'embryon dans les cellules somatiques, malgré des modifications globales de déméthylation des chromosomes mâle et femelle qui se produisent après la fécondation. Les empreintes sont effacées dans les cellules germinales primordiales (chromosomes gris) puis ré-établies pour la nouvelle génération.

D'après Plassschaert, R.N. et Bartolomei, M.S. : Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. Development 2014, **141** : 1805-1813.



Fig. 10.13 Empreinte des gènes

contrôlant la croissance embryonnaire. Chez les embryons de souris, le gène du facteur de croissance insuline-like2 (*Igf2*) d'origine paternelle s'exprime, contrairement au gène présent sur le chromosome maternel qui, lui, n'est pas exprimé. À l'inverse, le gène étroitement lié *H19* d'origine maternelle s'exprime dans les cellules de l'embryon, alors que celui d'origine paternelle ne s'exprime pas. Les gènes soumis à l'empreinte affectent non seulement le développement précoce mais aussi la croissance de l'embryon. Des preuves plus tardives que de tels gènes sont impliqués dans la croissance embryonnaire, sont venues de l'étude de chimères réalisées entre des embryons normaux et des embryons androgénétiques ou gynogénétiques. Quand les cellules de la masse cellulaire interne de gynogénotes sont injectées dans des embryons normaux, la croissance est retardée d'au moins 50 %, alors que si des cellules d'androgénotes sont injectées, la croissance de l'embryon chimère est augmentée de 50 %. Ainsi l'empreinte subie par des gènes dans le génome mâle augmente de manière significative la croissance de l'embryon.

Au moins 80 gènes soumis à une empreinte ont été identifiés chez les mammifères, certains d'entre eux permettant la production d'**ARN non codants** (ARNnc), des ARN ayant des rôles de régulateurs de l'expression géniques tels les microARN (voir Encart 6C), et aussi de longs ARN non codants. D'autres gènes soumis à l'empreinte sont impliqués dans le contrôle de la croissance. Le facteur de croissance de type insuline IGF-2 est nécessaire pour la croissance embryonnaire et son gène *Igf2* est soumis à l'empreinte étant seul actif (Fig. 10.13). Une preuve directe que ce gène est soumis à l'empreinte est donnée par l'observation que lorsqu'un ovule normal est fécondé par un spermatozoïde porteur d'un gène *Igf2* muté inactif, l'embryon formé est de petite taille. Ceci s'explique par le fait que des taux extrêmement bas de IGF-2 sont produits à partir du gène maternel soumis à l'empreinte et que ceux-ci ne permettent pas de compenser la perte de synthèse d'IGF-2 à partir du génome paternel. En revanche, si la mutation est portée par le génome de l'ovule, le développement est normal, grâce à l'expression du gène paternel.

Étroitement lié au gène *Igf2* sur le chromosome 7 de souris, le gène *H9* permet la synthèse de deux microARN. *H19* est soumis à une empreinte opposée à celle du gène *Igf2* en s'exprimant à partir du chromosome maternel mais pas à partir du paternel (voir Fig. 10.13). En manipulant les chromosomes d'un ovule, il a été possible d'obtenir un œuf diploïde ne contenant que des chromosomes maternels dont l'un porte les gènes *Igf2* et *H19* soumis à l'empreinte femelle normale tandis que l'autre porte *Igf2* non soumis à l'empreinte, comme dans les cellules germinales mâles (*H19* était absent de ce second chromosome). L'œuf a pu se développer normalement contrairement à un embryon dont le génome est d'origine exclusivement maternelle.

Une explication possible en termes d'évolution de la réciprocité des empreintes des gènes contrôlant la croissance fait appel à la théorie du conflit parental. Selon cette théorie, les stratégies reproductives du père et de la mère sont différentes, l'empreinte paternelle favorisant la croissance embryonnaire alors que l'empreinte maternelle la freine. Le père désire une croissance maximale pour ses descendants afin de favoriser la survie et la transmission de ses gènes, ce qui peut être réalisé par l'existence d'un gros placenta, suite à la production de l'hormone de croissance stimulée par IGF-2. La mère qui peut s'accoupler avec différents mâles, a avantage à répartir équitablement ses ressources entre tous ses descendants, et cherche donc à éviter une croissance trop importante de chaque embryon. Ainsi, un gène qui favorise la croissance embryonnaire est éteint chez la mère. Les gènes paternels exprimés dans la descendance pourraient être sélectionnés afin de soutirer davantage de ressources de la mère, car ces gènes ont une probabilité moindre d'être présents chez les autres enfants de la mère. Il est à noter que beaucoup d'effets, autres que ceux sur la croissance, sont dus à des gènes soumis à une empreinte.

L'empreinte se produit pendant la différenciation des cellules germinales, et donc un mécanisme est nécessaire pour à la fois maintenir l'influence de l'empreinte durant tout le développement et pour l'effacer au cours du nouveau cycle de développement d'une cellule germinale. Un mécanisme de maintien de l'empreinte est la méthylation de l'ADN, une modification épigénétique consistant en la fixation de groupes méthyle sur des cytosines de l'ADN. Comme cela a été vu dans le Chapitre 8, la méthylation de l'ADN est associée à la répression de l'expression des gènes. La preuve que la méthylation de l'ADN est nécessaire pour l'empreinte a été donnée chez des souris où le processus de méthylation étant anormal, le gène *Igf2* n'est pas longtemps soumis à l'empreinte et s'exprime aussi bien sur le chromosome maternel que paternel. En plus de la méthylation de l'ADN, d'autres facteurs ont été impliqués dans l'empreinte tels que les ARNnc, des protéines du groupe Polycomb, et des modifications chimiques des histones (voir Encart 8A). Certains de ces ARNnc sont impliqués dans la mise sous empreinte de gènes voisins de ceux qui permettent leur production. Ainsi, le long ARNnc *Airn* (ARN anti-sens de *Igfr2*) est, par exemple, transcrit à partir du complexe de gènes *Igfr2* soumis à l'empreinte. *Igfr2* qui code un récepteur de l'IGF et les deux autres gènes du complexe sont exprimés à partir du chromosome maternel. *Airn* est quant à lui, exprimé à partir du chromosome paternel et réprime l'expression des trois gènes qui l'entourent, ce qui le rend responsable de l'empreinte paternelle du complexe.

Chez l'espèce humaine, certaines anomalies du développement sont associées à des gènes soumis à empreintes. L'une d'elle est le syndrome de Prader-Willi, causé par la perte d'expression de la copie paternelle d'un gène sur le chromosome 15, habituellement due à une délétion d'une petite région chromosomique portant ce gène. Les enfants ont un retard de croissance, peuvent présenter une forte obésité, un retard mental et des troubles du comportement du type compulsif obsessionnel. Le syndrome d'Angelman résulte de la perte de la même région chromosomique, mais sur le chromosome maternel 15 et se manifeste sous la forme d'un important retard moteur et mental. Le syndrome de Beckwith-Wiedermann est dû à une perturbation généralisée de l'empreinte sur une région du chromosome 7 qui se traduit par une surcroissance fœtale et une prédisposition accrue à développer des cancers.

RÉSUMÉ

Chez de nombreuses espèces, les cellules de la lignée germinales sont spécifiées par des déterminants cytoplasmiques localisés dans l'ovule, dont la localisation est contrôlée chez la mère par des cellules entourant l'ovocyte. En revanche, chez les mammifères, les cellules germinales ne sont pas spécifiées par des déterminants maternels, mais par des interactions intercellulaires dans l'embryon. Une fois que les cellules germinales sont déterminées, elles migrent depuis leur lieu d'origine jusqu'aux gonades où se déroulera leur différenciation. Dans les gonades, les cellules germinales diploïdes entrent en méiose, celle-ci permettant la formation des gamètes haploïdes. Le nombre d'ovocytes chez une femelle de mammifères est fixé avant la naissance, alors que la production de spermatozoïdes chez le mâle est continue pendant toute sa vie adulte. Les ovules sont toujours plus gros que les cellules somatiques, et chez certains groupes d'animaux sont de très grande dimension. Ces tailles volumineuses sont rendues possibles par des cellules somatiques spécialisées entourant l'ovocyte et qui lui fournissent certains constituants tels que le vitellus. De plus, certains gènes produisant des éléments nécessaires en grandes quantités peuvent être l'objet d'une amplification dans l'ovocyte.

Chez les mammifères, les génomes maternel et paternel sont nécessaires pour que le développement soit normal. Les embryons ayant un génome diploïde uniquement d'origine maternelle ou paternelle ont un développement anormal. Certains gènes dans les gamètes sont soumis à une empreinte, ce qui fait que pour un gène donné, son activité est différente en fonction de son origine maternelle ou paternelle. Plusieurs gènes sous empreinte sont impliqués dans le contrôle de la croissance de l'embryon. Des empreintes incorrectes peuvent conduire à des anomalies du développement dans l'espèce humaine.



Fécondation

La fécondation qui implique la fusion d'un ovule et d'un spermatozoïde, initie le développement. Chez beaucoup d'organismes marins, comme les oursins, les spermatozoïdes libérés dans l'eau sont attirés vers les ovules par chimiotactisme et nagent en remontant un gradient d'une molécule chimique. Les membranes de l'ovule et du spermatozoïde fusionnent, et le contenu de ce dernier pénètre dans l'ovule, le noyau spermatique devenant le pronucléus mâle. Chez les mammifères et beaucoup d'autres espèces, la fécondation déclenche l'achèvement de la méiose du gamète femelle, avec un lot de chromosomes constituant le pronucléus femelle, cependant que l'autre lot est expulsé avec le second globule polaire (voir Encart 10A). Les pronuclei mâle et femelle (voir Fig. 1.1) fusionnent pour former le noyau du zygote, ce dernier commençant à se diviser et à démarrer son propre programme de développement. La fécondation peut être soit externe, comme chez les grenouilles et les oursins, soit interne, comme chez la drosophile, les mammifères et les oiseaux. De tous les spermatozoïdes libérés par le mâle, un seul d'entre eux féconde un œuf vierge. Chez beaucoup d'animaux, dont les mammifères, la pénétration du spermatozoïde active un mécanisme qui prévient l'entrée d'un spermatozoïde surnuméraire évitant ainsi un surplus de lots de chromosomes qui provoquerait un développement anormal ou une létalité, comme c'est le cas pour des embryons humains. Dans ce chapitre, seront considérés les multiples mécanismes qui, en se superposant, permettent à un seul noyau spermatique de contribuer à la formation du noyau zygotique. Chez tous les mammifères, à l'exception des rongeurs, le centrosome du spermatozoïde pénètre dans l'ovule et devient celui du zygote. Son altération pourrait être une des causes possibles de l'infertilité masculine dans l'espèce humaine.

L'ovule et le spermatozoïde présentent des spécificités structurales ayant pour finalité la fécondation, le premier pour prévenir une polyspermie, le second pour assurer la pénétration dans l'ovule. Ainsi, les œufs non fécondés sont habituellement entourés par plusieurs couches protectrices accolées extérieurement à la membrane plasmique ovulaire. De plus, chez beaucoup d'espèces, se situe juste en dessous de la membrane plasmique, une couche de **granules corticaux** dont la libération du contenu au moment de la fécondation aide à ce que soit bloquée l'entrée de spermatozoïdes surnuméraires. L'ensemble de ces barrières ne permet un accès à l'œuf qu'à un petit nombre de spermatozoïdes.

10.9 La fécondation fait intervenir des interactions de surface entre les gamètes

Les spermatozoïdes sont des cellules mobiles, typiquement conçues pour activer l'ovule et en même temps délivrer leur noyau dans son cytoplasme. Leurs constituants essentiels sont un noyau, des mitochondries qui fournissent une source énergétique, d'un centrosome et d'un flagelle pour la locomotion (Fig. 10.4). L'extrémité antérieure, hautement spécialisée, favorise la pénétration dans l'ovule. Les spermatozoïdes de *C. elegans* et de certains autres non-vertébrés sont atypiques car ils ressemblent plus à des cellules somatiques et se déplacent par des mouvements amœboïdes.

Après avoir été introduits dans le tractus génital d'un mammifère femelle, les spermatozoïdes subissent un phénomène de **capacitation**, qui facilite la fécondation et qui comporte un remodelage membranaire ainsi que la suppression de facteurs inhibiteurs. Il n'y a qu'un très petit nombre d'ovules, généralement un ou deux chez les humains et une dizaine chez les souris, qui sont susceptibles d'être atteints par moins



Fig. 10.14 Spermatozoïde humain.

L'acrosome à l'extrémité antérieure du spermatozoïde contient des enzymes qui sont utilisées pour digérer les couches protectrices entourant l'ovule. La membrane plasmique au niveau de la tête du spermatozoïde comporte diverses protéines spécialisées qui se fixent aux enveloppes de l'œuf et qui facilitent sa pénétration. Le spermatozoïde se déplace grâce à son unique flagelle dont le fonctionnement est assuré énergétiquement par les mitochondries. La longueur totale de la tête à la queue est d'environ 60 µm.



Fig. 10.15 Fécondation d'un ovule de mammifère. Après avoir traversé la couche de cellules folliculaires de la corona radiata, le spermatozoïde se fixe à la zone pellucide (1). Ceci déclenche la réaction acrosomique (2), où l'acrosome libère des enzymes qui déstabilisent la zone pellucide. Cela permet au spermatozoïde de traverser cette dernière et de se fixer à la membrane de l'ovule (3). Celle-ci fusionne avec la membrane plasmique de la tête du spermatozoïde et en quelques minutes se produit l'exocytose des granules corticaux (4). Le contenu du spermatozoïde, dont le noyau, pénètre ensuite dans l'ovule (5). À ce moment, la totalité de la méiose est achevée au niveau de l'ovule et un pronucléus femelle a été formé.

Illustration d'après Alberts, B., et al. : Molecular Biology of the Cell, 2nd edition, New York : Garland Publishing, 1989.

d'une centaine de spermatozoïdes sur les millions présents dans l'éjaculat, et donc susceptibles d'être fécondés.

Le spermatozoïde doit franchir plusieurs barrières pour pénétrer dans l'ovule (Fig. 10.15). Chez les mammifères, la première d'entre elles est la corona radiata formée par des cellules folliculaires emballées dans une couche visqueuse d'acide hyaluronique et qui ont été éjectées avec l'ovule. Ces cellules sont dites du cumulus, en raison de l'image « nuageuse » sous laquelle apparaît l'œuf libéré par l'ovaire quand il est observé avec un microscope à faible résolution. La première souris clonée a été nommée Cumulina, ayant été produite en utilisant un noyau de ce type de cellule (voir Chapitre 8). L'activité hyaluronidase de la tête du spermatozoïde aide à traverser cette première couche péri-ovulaire. Puis le spermatozoïde est confronté à la **zone pellucide**, couche de glycoprotéines fibreuses sécrétées par l'ovocyte, qui forme une barrière qui est franchie grâce à la **réaction acrosomique**, au cours de laquelle sont libérées les enzymes contenues dans l'**acrosome**, une vésicule d'origine golgienne située dans la tête du spermatozoïde (voir Fig. 10.14).

Les spermatozoïdes de mammifères portent des protéines de surface qui sont impliquées dans la fixation à la zone pellucide puis à sa pénétration. L'une d'elles est la protéine adhésive SED1. Après avoir quitté le testicule, le spermatozoïde est recouvert par cette protéine qui est sécrétée par les cellules de l'épithélium épididymaire. Des souris mâles *SED1*^{-/-}, chez lesquelles les deux exemplaires du gène sont invalidés, sont peu fertiles. Après cette adhérence initiale due à SED1 et à d'autres constituants, des protéines de la membrane plasmique de la tête du spermatozoïde se lient à la glycoprotéine ZP2 de la zone pellucide. Au cours de la pénétration des couches péri-ovulaire, un signal est émis dans le spermatozoïde conduisant à la libération du contenu de l'acrosome par exocytose. Les enzymes acrosomiques en détruisant les chaînes latérales oligosaccharidiques des glycoprotéines de la zone pellucide, provoquent la formation d'un trou par lequel le spermatozoïde pourra s'approcher de la membrane plasmique ovulaire. Chez beaucoup de non-vertébrés, tel l'oursin, la réaction acrosomique se traduit par la formation d'un tube acrosomique, suite à une polymérisation d'actine cytoplasmique, ce qui favorise le contact avec la membrane plasmique ovulaire.

La réaction acrosomique permet aussi d'exposer des protéines à la surface du spermatozoïde, qui peuvent se lier à la membrane de l'ovule et jouer un rôle dans la reconnaissance mutuelle et dans la fusion des membranes des deux gamètes. L'une d'elles, appelée Izumo, nom d'un sanctuaire de mariage japonais, est essentielle pour le processus de fusion membranaire. Son ligand sur la membrane ovulaire est un récepteur de folate, nommé Juno, du nom de la déesse romaine (Junon) de la fertilité et du mariage. Des femelles et des mâles de souris transgéniques ne produisant respectivement pas Juno et Izumo, sont stériles. Ces deux mêmes protéines interviennent dans la fusion des gamètes chez l'homme. Les ovules humains et de divers mammifères peuvent être fécondés in vitro et les très jeunes embryons, au stade de pré-blastocyste, être implantés dans l'utérus de la mère et se développer normalement. Cette méthode de fécondation in vitro (FIV) a été d'une grande aide pour des couples ayant, pour des raisons diverses, des difficultés à avoir un enfant. Un ovule humain peut même être fécondé in vitro par l'injection directe d'un seul spermatozoïde, méthode connue sous le nom d'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), qui est utile quand une infertilité est due à l'incapacité des spermatozoïdes à pénétrer dans un ovule.

10.10 Des modifications de la membrane plasmique et des enveloppes de l'ovule bloquent la polyspermie lors de la fécondation

Bien que beaucoup de spermatozoïdes se fixent sur les enveloppes entourant l'ovule, et même atteignent sa membrane plasmique, il importe qu'un seul noyau spermatique fusionne avec le noyau ovulaire afin d'éviter la constitution d'un lot chromosomique non équilibré létal, pour l'embryon. Divers organismes possèdent différents moyens pour assurer la fécondation par un seul spermatozoïde. Chez les oiseaux, par exemple, beaucoup de spermatozoïdes pénètrent dans l'ovule, mais un seul noyau fusionne avec le noyau ovulaire, les autres étant détruits dans le cytoplasme. Il est possible ici, que l'endroit par lequel le spermatozoïde pénètre dans l'ovule soit important, celui pénétrant directement dans la vésicule germinative contenant les chromosomes étant le fécondant. L'ADN des spermatozoïdes entrés hors de cette zone est probablement dégradé par les ADNases cytoplasmiques, dont la présence a été détectée dans des œufs de caille. L'entrée de plus d'un spermatozoïde est en revanche évitée chez les oursins et les mammifères, et correspond à un **blocage de la polyspermie**.

Les ovules des oursins et du xénope présentent un blocage de la **polyspermie** en deux temps, un initial rapide suivi d'un plus lent. La fécondation étant externe leurs ovules sont probablement mis en présence avec un grand nombre de spermatozoïdes, alors que chez les mammifères, relativement peu de spermatozoïdes atteignent au final les trompes de Fallope, lieu de la fécondation. Aussi chez ces deux espèces, l'utilité d'une signalisation immédiate dès qu'un spermatozoïde a fusionné avec la membrane ovulaire paraît justifiée. Un **blocage rapide** de la pénétration constituant une première barrière à la polyspermie chez l'oursin, et de manière similaire chez le xénope, est déclenché en quelques secondes par une dépolarisation transitoire de la membrane plasmique ovulaire, le potentiel de membrane passant de -70 mV à +20 mV dans les secondes qui suivent l'entrée du spermatozoïde (Fig. 10.16). Ce potentiel revient ensuite lentement à son niveau de départ. Si la dépolarisation est



Fig. 10.16 Dépolarisation de la membrane plasmique de l'ovule d'oursin lors de la fécondation. Le potentiel membranaire de

fécondation. Le potentiel membranaire de repos d'un ovule d'oursin est de -70 mV. À la fécondation, il se modifie rapidement pour atteindre +20 mV puis retourne lentement à sa valeur de départ. Cette dépolarisation permet un blocage rapide de la pénétration de spermatozoïdes surnuméraires, ce qui constitue une première barrière à la polyspermie.



empêchée, une polyspermie se produit, mais la manière dont cette dépolarisation la bloque reste encore peu claire.

Chez l'oursin, alors que se re-polarise la membrane plasmique de l'œuf, une membrane de fécondation imperméable se forme entourant ce dernier. Ceci constitue un blocage lent de la polyspermie et correspond à une seconde barrière, déclenché par une libération de calcium dans l'œuf, due à l'entrée du spermatozoïde, qui conduit les granules corticaux à déverser extérieurement leur contenu par exocytose. Cette onde calcique active également le démarrage du développement, comme cela sera évoqué dans la section suivante. L'ovule d'oursin est entouré d'une membrane vitelline correspondant à la zone pellucide des mammifères. La libération du contenu des granules dans l'espace situé entre la membrane plasmique et la membrane vitelline entraîne le décollement de cette dernière de la membrane plasmique. Les constituants des granules corticaux provoquent une réticulation des molécules de la membrane vitelline la transformant en une membrane de fécondation rigidifiée, et sont également à l'origine d'une couche hyaline supplémentaire gélifiée entre les membranes de fécondation et plasmique (Fig. 10.17). De plus, certaines des enzymes libérées dégradent les protéines de liaison aux spermatozoïdes, et toutes ces modifications contribuent à empêcher l'accès d'un spermatozoïde surnuméraire à l'ovule. La membrane de fécondation chez l'oursin se résorbe au stade blastula, ce qui permet l'« éclosion » de la blastula.

Chez les mammifères, dont l'espèce humaine, le parcours des spermatozoïdes dans le tractus génital est régulé et relativement peu de gamètes sont en mesure de réaliser la fécondation de l'ovule. La polyspermie est empêchée chez les mammifères par les modifications qui touchent la zone pellucide et la membrane plasmique ovulaire une fois que le spermatozoïde a pénétré dans l'ovule. Il n'y a pas de blocage électrique rapide de la polyspermie chez les ovules de mammifères, mais se produit un blocage lent similaire à celui observé chez l'oursin et le xénope, qui se déroule dans les 30 minutes à une heure suivant la fécondation. Après que le premier spermatozoïde a fusionné avec la membrane plasmique, les granules du cortex ovulaire déversent par exocytose leurs contenus qui forment une couche directement accolée à la membrane plasmique. Un des constituants granulaires est une protéase, l'ovastacin, qui coupe la protéine ZP2 de la zone pellucide, rendant impossible la fixation des spermatozoïdes.

Les ovules de mammifères présentent aussi un blocage membranaire de la polyspermie qui se développe sur une période de temps similaire à celle de ce qui se produit au niveau de la zone pellucide. Ce blocage membranaire a été démontré avec des ovules de souris dont la zone pellucide a été enlevée avant une fécondation *in vitro*. Une seconde mise en présence d'œufs fécondés avec des spermatozoïdes, montre que très peu de ceux-ci entrent dans l'œuf. C'est la disparition du récepteur Juno, évoqué plus haut à propos de la reconnaissance spermatozoïde-ovule, de la membrane plasmique ovulaire, 40 minutes environ après la fécondation, qui est à la base du blocage membranaire de la polyspermie chez les mammifères.

10.11 La fusion ovule-spermatozoïde provoque une onde calcique à l'origine de l'activation de l'œuf

Lors de la fécondation, l'activation ovulaire provoque une série d'événements qui initient le développement. Chez l'œuf d'oursin, par exemple, la synthèse protéique augmente de plusieurs fois, et il se produit souvent des modifications structurales

Fig. 10.17 Réaction corticale lors de la fécondation chez l'oursin. L'ovule est entouré d'une membrane vitelline plaquée extérieurement contre la membrane plasmique. Une couche de granules corticaux est située juste en dessous de cette dernière. Lors de la fécondation, les granules fusionnent avec la membrane plasmique, et certains de leurs constituants sont libérés par exocytose. Ceux-ci adhèrent à la membrane vitelline pour former une membrane de fécondation rigidifiée qui se décolle de la surface ovulaire et empêche la pénétration de spermatozoïdes surnuméraires. D'autres constituants issus des granules sont à l'origine d'une couche hyaline, qui enveloppe l'ovule sous la membrane de fécondation.



Fig. 10.18 Vague calcique liée à la fécondation. Série d'images montrant une vague calcique intracellulaire lors de la fécondation d'un ovule d'oursin. Le spermatozoïde fécondant a fusionné juste en haut à gauche de l'ovule et a déclenché la vague calcique. La concentration des ions calcium est suivie en microscopie confocale grâce à un colorant fluorescent affin au calcium. La concentration calcique est révélée en fausses couleurs : rouge pour les plus fortes concentrations, puis jaune, vert, et bleu. Les temps indiqués sont les secondes suivant l'entrée du spermatozoïde. Photographie aimablement communiquée par M. Whitaker.

de l'œuf, telle la rotation corticale observée chez les amphibiens (voir Fig. 4.3). Les ovules des vertébrés, bloqués jusqu'alors en métaphase de deuxième division de méiose (voir Encart 10A), achèvent cette dernière, puis la fusion des pronucléi constitue les génomes zygotiques diploïdes avant que les œufs fécondés n'entrent en mitose. Chez la souris et l'espèce humaine, les membranes des pronucléi disparaissent avant que ces derniers ne se rencontrent. Chez les mammifères, les mitochondries des spermatozoïdes sont éliminées, et ainsi toutes les mitochondries dans l'œuf fécondé sont d'origine maternelle. Le génome mitochondrial est par conséquent transmis tout au long de la lignée femelle sous une forme inchangée sauf en cas de mutations occasionnelles. Ceci fait de l'ADN mitochondrial un excellent matériel pour les études qui utilisent les rares modifications de séquences accumulées dans les génomes mitochondriaux chez les hommes actuels afin de suivre les migrations de leurs plus anciens ancêtres hors de l'Afrique et leur dispersion dans les diverses parties du monde.

La fécondation et l'activation de l'ovule sont associées à une libération brutale d'ions calcium libres (Ca⁺⁺) à partir de compartiments de stockage dans l'ovule, produisant dans celui-ci une onde calcique qui le traverse (Fig. 10.18). Cette libération de calcium est déclenchée par la pénétration du spermatozoïde. Chez l'oursin, l'onde part du point d'entrée du spermatozoïde et se propage dans l'ovule à la vitesse de 5 à 10 mm par seconde. Chez tous les mammifères, des oscillations de la concentration de calcium se poursuivent pendant plusieurs heures après la fécondation jusqu'à la formation du pronucléus femelle. La décharge calcique est déclenchée par l'activité d'une enzyme spermatique spécifique, la phospholipase C zeta. Celle-ci initie une signalisation conduisant à la production d'un second messager, l'inositol 1,4,5-triphosphate, qui en agissant sur des récepteurs endomembranaires, provoque la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique.

L'augmentation brutale du Ca⁺⁺ libre est le déclencheur naturel de l'activation ovulaire, bien que les ovules de souris puissent être activés sans un quelconque changement des taux de calcium. Les ovules de beaucoup d'espèces peuvent être activés par une augmentation artificielle de la concentration du Ca⁺⁺ dans le cytosol, par injection directe de Ca⁺⁺, par exemple. Inversement, en prévenant cette augmentation de Ca⁺⁺ par l'injection d'agents qui s'y lient, comme l'EGTA, l'activation est bloquée. Des ovules de xénope peuvent être activés simplement en les piquant à l'aide d'une aiguille en verre, ce qui crée un influx local de calcium au site de la piqûre qui déclenche une onde calcique.

Le calcium provoque l'achèvement de la méiose dans les œufs fécondés en agissant sur les protéines qui contrôlent le cycle cellulaire. Les ovules de xénope sont maintenus en métaphase de la seconde division de méiose par la présence à un niveau élevé d'un complexe protéique appelé facteur de maturation ou encore d'entrée en mitose (MPF pour Maturation Promoting Factor) qui est un complexe associant une kinase cycline-dépendante (Cdk pour Cyclin-dependent kinase) et sa partenaire, la cycline B. Les effets du MPF se manifestent par la phosphorylation de protéines cibles variées par la kinase. Pour que la méiose s'achève, le niveau d'activité du MPF doit diminuer (Fig. 10.19). Des complexes similaires à celui de cycline B-Cdk contrôlent le cycle cellulaire mitotique (voir Section 13.2). L'onde calcique résulte de l'activation d'une enzyme, la protéine kinase II dépendante de la calmoduline. L'activité de cette kinase découle indirectement de la dégradation de la cycline du MPF, ce qui permet à l'ovule d'achever sa méiose. À la suite de cela, les génomes mâle et femelle subissent des modifications globales de déméthylation et les pronucléi mâle et femelle sont formés. Ces derniers fusionnent ensuite, et le zygote franchit une nouvelle étape de son développement, en entrant dans les cycles cellulaires mitotiques de la segmentation.



RÉSUMÉ

La fusion entre un spermatozoïde et un ovule lors de la fécondation conduit le zygote à se diviser et à se développer. Les deux gamètes possèdent des structures spécialisées liées à la fécondation. La fixation initiale du spermatozoïde à un œuf de mammifère est assurée par des molécules de la zone pellucide chez les mammifères, ou son équivalent, la membrane vitelline, chez les oursins. Cette fixation provoque la libération du contenu de l'acrosome du spermatozoïde, ce qui facilite la pénétration de ce dernier à travers les enveloppes entourant l'ovule et lui permet d'accéder jusqu'à la membrane plasmique de celui-ci. Un blocage de la polyspermie fait qu'un seul spermatozoïde peut fusionner avec l'ovule et y introduire son noyau. Chez les mammifères, un premier blocage résulte du déversement des contenus des granules corticaux par exocytose qui modifie la zone pellucide, et un second blocage est dû à des modifications de la membrane plasmique ovulaire. Un rôle clé dans l'activation de l'œuf après sa fécondation est joué par la libération dans le cytosol d'ions calcium libres, qui se répandent sous la forme d'une onde à partir du site de fusion avec le spermatozoïde. Chez les mammifères et la plupart des vertébrés, la fécondation déclenche la fin de la seconde division de méiose. Les pronucléi haploïdes mâle et femelle, en fusionnant, forment le noyau du zygote, et l'œuf fécondé commence à se diviser.

Fig. 10.19 Profil de l'activité du facteur de maturation (MPF pour Maturation-Promoting Factor) lors du développement précoce du xénope. Le cycle cellulaire de l'ovocyte immature de xénope est bloqué. Suite à un stimulus hormonal par la progestérone, le cycle redémarre et la première division de méiose s'achève avec l'expulsion du premier globule polaire. L'ovocyte entre en deuxième division de méiose mais est de nouveau bloqué, en métaphase. L'ovule est pondu à ce stade. Lors de la fécondation, la vague calcique provogue l'achèvement de la méiose, et le second globule polaire est expulsé. Le zygote commence à se diviser rapidement par mitoses. L'activité du facteur de la maturation (MPF) augmente de manière brutale juste avant chaque division de méiose et les cycles cellulaires mitotiques, puis décroît brusquement et reste basse entre les mitoses successives.



Détermination du phénotype sexuel

Chez les organismes qui présentent des individus sexuellement différents, une modification du programme de développement de base est nécessaire pour que s'établissent les caractéristiques propres à chaque sexe. Initialement, le développement est similaire quel que soit le sexe de l'embryon, les différences n'apparaissant que plus tardivement. Chez les espèces considérées ici, le phénotype sexuel somatique, est génétiquement fixé lors de la fécondation par les chromosomes des gamètes qui fusionnent pour former la cellule œuf. Chez les mammifères, par exemple, le sexe est déterminé par le chromosome Y : les mâles sont XY et les femelles XX.

Cependant, même chez les vertébrés, le sexe n'est pas toujours dû à une détermination chromosomique : chez les alligators, c'est la température ambiante lors de la période d'incubation de l'embryon qui est déterminante, et certains poissons peuvent changer de sexe à l'état adulte en réponse à des conditions environnementales. Chez les insectes, les mécanismes du déterminisme du sexe sont très diversifiés. Il ne sera ici question que des organismes pour lesquels les bases génétiques et moléculaires de la détermination du sexe sont les mieux comprises (les mammifères, la drosophile et *C. elegans*) et qui présentent tous une détermination chromosomique, même si les mécanismes sont assez différents.

Dans un premier temps seront considérées la détermination du phénotype sexuel somatique puis la détermination du sexe au niveau des cellules germinales, c'est-àdire leur devenir en ovules ou en spermatozoïdes, et pour finir, sera envisagé comment les embryons compensent les différences chromosomiques entre mâles et femelles.

10.12 Le principal gène de détermination du sexe est sur le chromosome Y chez les mammifères

Le sexe génétique des mammifères est établi au moment de la conception, quand le spermatozoïde introduit un chromosome soit X soit Y dans l'ovule (Fig. 10.20). Ce dernier ne contenant qu'un chromosome X, si le spermatozoïde apporte un autre X, l'embryon sera une femelle, si c'est un Y, ce sera un mâle. La présence du chromosome Y est responsable du développement des testicules, et les hormones qu'ils produisent déclenchent la formation de tous les tissus somatiques selon un type mâle et éliminent le développement femelle. En l'absence du chromosome Y, le développement des tissus somatiques se réalise selon un type femelle. La spécification des gonades en tant que testicules est contrôlée par un seul gène porté par le chromosome Y, *SRY* chez les humains et *Sry* chez la souris (**région déterminante du sexe sur le chromosome Y** pour *Sex-determining Region of the Y chromosome*), dont le produit était primitivement connu comme le facteur de détermination testiculaire.

La preuve qu'une région du chromosome Y détermine la masculinité a d'abord été fournie par deux syndromes humains rares : le syndrome de Klinefelter, pour lequel les individus, des hommes, ont deux chromosomes X et un Y (XXY), et le syndrome de Turner où les individus n'ont qu'un chromosome X (XO) et sont des femmes. Dans les deux cas, les individus présentent certaines anomalies : les individus XXY sont des mâles stériles avec de petits testicules, tandis que les individus XO ne produisent pas d'ovules. Il existe également de rares cas où des individus XY sont des femmes, et des individus XX sont phénotypiquement des hommes, dus à ce qu'une partie du chromosome Y a été perdue (cas des femmes XY) ou a été transférée sur un chromosome X (cas des hommes XX). Ces accidents peuvent se produire au cours de la méiose lors de la spermatogenèse quand les chromosomes X et Y sont appariés, et qu'un *crossing-over* existe entre eux. Très rarement, un tel *crossing-over* peut transférer le gène *SRY* du chromosome Y sur le X (Fig. 10.21), entraînant ainsi une inversion du sexe.

La région de détermination du sexe suffit à elle seule pour spécifier la masculinité, comme cela a été montré expérimentalement chez la souris par l'introduction du gène *Sry* dans des œufs XX. Ces embryons transgéniques se développent en mâles, même si leur manquent tous les autres gènes portés par le chromosome Y. La présence du gène *Sry*, qui code un facteur de transcription à boîte HMG, provoque le développement de testicules au lieu d'ovaires chez ces embryons XX. Chez ces derniers, comme chez des



Fig. 10.20 Les chromosomes sexuels humains. Si deux chromosomes X sont présents (XX), une femelle se développe, cependant que la présence d'un chromosome Y conduit au développement d'un mâle (XY). L'encart montre une représentation des bandes sur les chromosomes, correspondant à des régions à forte condensation chromatinienne. mâles normaux, *Sry* est exprimé dans les gonades en développement juste avant leur évolution en testicules et déclenche la différenciation de cellules de Sertoli spécifiques des testicules et non de cellules folliculaires ovariennes. Cependant, ces mâles XX + *Sry* sont stériles, signifiant ainsi que d'autres gènes portés par le chromosome Y sont nécessaires pour le développement des spermatozoïdes.

10.13 Le phénotype sexuel des mammifères est régulé par des hormones gonadiques

Tous les embryons de mammifères, quel que soit leur sexe génétique, suivent au départ une voie de développement sexuellement neutre. Le sexe des gonades est déterminé génétiquement dans la mesure où la présence d'un chromosome Y fait que les tissus somatiques des gonades embryonnaires vont former des testicules plutôt que des ovaires. Les testicules sécrètent une **hormone anti-müllerienne** qui empêche le développement femelle en provoquant la régression des ébauches embryonnaires du tractus femelle. Ils induisent également la différenciation des cellules de Leydig sécrétant l'hormone mâle, la testostérone, qui stimule le développement des organes reproducteurs mâles. Chez les individus XX, l'absence d'un Y fait que des ovaires se forment et tout le développement sera par conséquent de type femelle.

Le rôle des hormones dans le développement sexuel des mammifères signifie que bien que le sexe des gonades soit génétiquement déterminé, toutes les autres cellules corporelles sont neutres, indépendamment de leur sexe chromosomique. Peu importe qu'elles soient XX ou XY, puisque leurs futures caractéristiques sexuées sont contrôlées par des hormones. Le rôle fondamental des testicules dans le développement de type mâle a été montré en prélevant les ébauches gonadiques à des embryons de lapin. Tous les embryons se sont développés en femelles, indépendamment des chromosomes sexuels présents. Pour se développer comme mâle, un testicule doit donc être présent, celui-ci exerçant ses effets sur la différenciation sexuée des tissus somatiques principalement par la sécrétion de testostérone.

Les gonades des mammifères se développent en association étroite avec le **mésonéphros**, ce rein embryonnaire contribuant chez les mâles et femelles, à la formation des organes reproducteurs. Associés au mésonéphros, les **canaux de Wolff** courent de chaque côté du corps jusqu'à un orifice indifférencié, le cloaque. Une autre paire de canaux, les **canaux de Müller**, parallèles aux canaux de Wolff, s'ouvrent également au niveau du cloaque. Au début du développement des mammifères, avant la différenciation gonadique, ces deux types de canaux sont présents (Fig. 10.22). Chez les femelles, en l'absence de testicules, les canaux de Müller se développent en **oviductes** (**trompes de Fallope**) qui transportent les œufs des ovaires jusqu'à l'utérus cependant que les canaux de Wolff dégénèrent.

Chez les mâles, l'expression de *Sry* conduit à la différenciation des cellules de Sertoli, cellules somatiques des testicules essentielles pour la formation de ces derniers et pour la spermatogenèse puisqu'elles retiennent les cellules germinales colonisatrices des gonades. Le développement de ces cellules entraîne une régulation positive de la production du facteur de transcription Sox9, qui induit la production et la sécrétion de l'**hormone anti-mullérienne**. Cette hormone protéique induit à son tour la régression des canaux de Müller, en grande partie par apoptose. FGF-9 est également nécessaire pour la différenciation des cellules de Sertoli et les souris mâles dépourvues du gène *fgf9* se développement d'ovaires en réprimant l'expression de *Sox9*. Ainsi, le développement d'un testicule nécessite une répression active des voies du développement femelle (Fig. 10.23).

La lignée cellulaire interstitielle testiculaire est à l'origine des cellules de Leydig qui produisent la testostérone. Sous l'influence de celle-ci, les canaux de Wolff se développent en **canaux déférents** qui transportent le sperme jusqu'au pénis et apparaissent les principaux caractères sexuels secondaires distinguant mâles et femelles, c'est-à-dire la réduction des glandes mammaires chez les mâles et le développement chez eux d'un pénis et d'un scrotum au lieu d'un clitoris et des lèvres chez les femelles (Fig. 10.24). Au début du développement, rien ne distingue les régions génitales mâles et femelles, les différences n'apparaissant qu'après le développement des gonades suite à l'activité de la testostérone chez les mâles. Par exemple, dans



Fig. 10.21 Inversion du sexe chez l'homme dû à un échange chromosomique. Lors de la méiose dans les cellules germinales mâles, les chromosomes X et Y s'apparient (au centre). Un *crossing-over* dans la région distale (croix bleue) n'affecte pas le développement sexuel (à gauche). Dans de rares cas, le *crossing-over* peut concerner une portion plus grande incluant le gène *SRY* (croix rouge), ce qui fait que le chromosome X porte maintenant le gène déterminant de la masculinité (à droite).

Illustration d'après Goodfellow, P.N., Lovell-Badge, R. : **SRY and sex determination** *in mammals*. Ann. Rev. Genet. *1993*, **27** : 71-92.





Fig. 10.23 Interactions génétiques déterminant le sexe des gonades chez les mammifères. Chez les mâles, la protéine SRY régule à la hausse l'expression de *Sox9* dans les cellules des testicules en cours de formation, l'expression de *Sox9* s'autorégulant ensuite. La protéine Sox9 régule à la hausse l'expression de *Fgf9*, et le signal FGF9 réprime l'expression de *Vint4*. La signalisation Wnt4 réprime l'expression de *Sox9*. Si cette dernière signalisation n'est pas réprimée, le développement mâle ne se réalise pas.

D'après Jameson, S.A., et al. : **Testis** development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. Dev. Biol. 2012, **370** : 24-32. Fig. 10.22 Développement des gonades et des structures associées chez les

mammifères. À gauche : au début du développement, aucune différence n'est constatée entre mâles et femelles au niveau des structures à l'origine des gonades et des organes associés. Les futures gonades sont proches du mésonéphros, reins embryonnaires non fonctionnels chez les mammifères adultes. (Le rein définitif se forme à partir du métanéphros d'où partent les uretères véhiculant l'urine jusqu'à la vessie). Deux types de canaux sont présents : les canaux de Wolff, rattachés au mésonéphros et les canaux de Müller, ces différents canaux débouchant dans le cloaque. À droite en haut : après la formation des testicules chez le mâle, leur sécrétion d'hormone anti-müllérienne entraîne la dégénérescence des canaux dé Müller par mort cellulaire programmée, tandis que les canaux de Wolff deviennent les canaux déférents, véhiculant les spermatozoïdes depuis les testicules. À droite en bas : chez les femelles, les canaux de Wolff disparaissent, également par apoptose, et les canaux de Müller deviennent les oviductes ainsi que l'utérus qui se forme dans la région terminale de ces canaux.

epithelium of tissue recombinants II. Instructive induction of Wolffian duct epithelia by neonatal seminal vesicle mesenchyme. Development 1989, **106**: 235-250.

l'espèce humaine, le tubercule génital est à l'origine du clitoris chez les femmes et de l'extrémité du pénis chez les hommes.

Le rôle des hormones dans le développement sexuel est illustré par des cas rares d'anomalies le concernant. Certains mâles XY présentent un phénotype femelle dans leur apparence externe, même s'ils possèdent des testicules et sécrètent de la testostérone. Ils présentent une mutation qui les rend insensibles à la testostérone du fait de l'absence de son récepteur, celui-ci étant, dans les conditions normales, présent dans tout le corps. Inversement, des femelles génétiques ayant une constitution XX complètement normale peuvent développer un phénotype mâle dans leur apparence externe, si elles ont été exposées à des hormones mâles au cours de leur développement embryonnaire.

Des comportements spécifiques sexuels sont aussi affectés par l'environnement hormonal en raison de ses effets sur le cerveau. Par exemple, des rats mâles castrés



Fig. 10.24 Développement des organes génitaux externes humains. Au début du développement embryonnaire, l'appareil génital externe est identique dans les deux sexes (à gauche). Après la formation des testicules chez les mâles, le tubercule et les replis génitaux donnent naissance au pénis (à droite en haut), tandis que ces derniers sont à l'origine du clitoris et des petites lèvres chez les femmes (à droite en bas). Les bourrelets génitaux forment le scrotum chez l'homme et les grandes lèvres chez la femme.

développent après leur naissance, un comportement sexuel caractéristique des femelles génétiques.

10.14 La détermination du sexe a pour premier signal le nombre de chromosomes X chez la drosophile et est autonome au niveau cellulaire

Les différences sexuelles visibles entre drosophiles mâles et femelles sont principalement les structures génitales bien qu'il existe aussi certaines variations dans la disposition des soies et la pigmentation, et que les mâles possèdent un peigne sexuel sur la première paire de pattes. Chez les mouches, la détermination sexuelle des cellules somatiques est autonome, c'est-à-dire qu'elle s'effectue cellule par cellule, et il n'y a aucun processus ressemblant à un contrôle hormonal de la différenciation somatique sexuelle. L'expression du sexe au niveau somatique est le résultat d'une série d'interactions géniques qui se trouve initiée par le signal sexuel primaire agissant comme un déclencheur génétique binaire mâle/femelle. Il s'ensuit que juste quelques gènes effecteurs s'expriment, dont l'activité contrôle la différenciation mâle ou femelle des cellules somatiques.

Comme pour les mammifères, les mouches du vinaigre ont des chromosomes sexuels de taille inégale, X et Y, les mâles étant XY et les femelles XX. Mais les similitudes s'arrêtent là. Chez les mouches, le sexe n'est pas déterminé par la présence d'un chromosome Y, mais par le nombre de X. Ainsi, les mouches XXY sont des femelles et les X0 des mâles. La composition chromosomique de chaque cellule somatique détermine sont développement sexuel. Ceci est bien illustré par l'existence d'individus mosaïques génétiquement chez lesquels le côté gauche de l'animal est XX et le droit X0, chaque moitié se développant respectivement en femelle et mâle (Fig. 10.25).

Chez les mouches, la présence de deux chromosomes X conduit à la production de la protéine Sex-lethal (Sxl) dont le gène est situé sur le chromosome X. Ceci entraîne un développement femelle *via* une cascade d'activation génique qui détermine en premier l'état sexuel et ensuite produit le phénotype. A l'extrémité de la voie de détermination du sexe, le gène *transformer (tra)* détermine comment l'ARNm du gène *doublesex (dsx)* est épissé. Celui-ci code un facteur de transcription dont l'activité est responsable de la plupart des aspects du sexe somatique. Le gène *dsx* s'exprime chez les mâles et les femelles, mais en raison d'un épissage sexe-spécifique de son ARNm, ses produits sont différents selon le sexe (Fig. 10.26). Les mâles et femelles produisent donc des protéines Doublesex (Dsx) distinctes, qui agissent dans les cellules somatiques pour induire l'expression de gènes spécifiques d'un sexe et réprimer



Fig. 10.25 Une drosophile génétiquement mosaïque femelle/mâle. Le côté gauche de la mouche est constitué de cellules XX et est de type femelle, tandis que le droit, composé de cellules X0, est de type mâle. Ce dernier a des ailes plus petites, une structure spécifique, le peigne sexuel, sur sa première paire de pattes, et des pièces génitales différentes à l'extrémité de l'abdomen (non montrées ici).

Fig. 10.26 Schématisation de la voie de la détermination du sexe chez la drosophile. Le nombre de chromosomes X est le signal initiant la détermination du sexe, et chez les femelles, la présence de deux X active le gène Sex-lethal (Sxl). Une protéine Sex-lethal est produite, ce qui n'est pas le cas chez les mâles qui ne possèdent qu'un chromosome X. Par l'intermédiaire du gène transformer (tra), l'activité de Sex-lethal provoque un épissage dépendant du sexe de l'ARN doublesex (dsx^f) engageant les cellules dans une voie de différenciation de type femelle. En l'absence de la protéine Sex-lethal, l'épissage de l'ARN doublesex donne un ARNm dsx^m qui conduit à une différenciation mâle.

Fig. 10.27 Production de la protéine Sex-lethal au cours de la détermination du sexe chez la drosophile. Quand deux chromosomes X sont présents, le promoteur précoce d'établissement (P) du gène Sexlethal (SxI) est activé au stade blastoderme syncytial, permettant la production d'une protéine SxI chez les futures femelles, mais pas chez les mâles. Plus tard, au stade blastoderme cellulaire, le promoteur de maintien (P_m) de Sxl devient actif chez les mâles et les femelles, alors que P_a ne l'est plus. L'ARNm SxI n'est correctement épissé que si la protéine Sxl est déjà présente, ce qui est le cas chez les femelles. Une boucle de rétroaction positive pour la production de Sxl est ainsi mise en place chez les femelles. La présence continue de SxI engendre une cascade d'activités géniques conduisant à un développement femelle. Si la protéine Sxl est absente, c'est un développement mâle qui se réalise.

Illustration d'après Cline, T.W. : The Drosophila sex determination signal : how do flies count to two ? Trends Genet. 1993, 9 : 385-390.



ceux codant les caractères du sexe opposé. En l'absence de Sxl, la production de la forme mâle de la protéine Dsx conduit à un développement de type mâle. En présence de Sxl, l'ARNm *tra* subit un épissage spécifique, ce qui conduit, avec un rôle aussi de la protéine Transformer-2, à la production de la forme femelle de la protéine Dsx menant à un développement de type femelle.

Une fois que le gène *Sex-lethal* (*Sxl*) est activé chez les femelles, il reste actif par un mécanisme d'autorégulation et la protéine Sxl reste synthétisée pendant tout le développement femelle. Une expression précoce de *Sxl* chez les femelles se produit *via* l'activation d'un promoteur P_e , à peu près au moment de la formation du blastoderme syncytial. À ce stade, la protéine Sxl est synthétisée et s'accumule dans les embryons femelles. Au stade blastoderme cellulaire, un autre promoteur de Sxl, P_m , entre en activité chez les mâles et les femelles et P_e devient inactif, alors que le sexe est déjà déterminé. L'épissage de l'ARN transcrit avec P_m en ARNm *Sxl* fonctionnel a besoin que soit déjà présente un peu de protéines Sxl, et ceci ne se réalise seulement que chez les femelles (Fig. 10.27).

Comment le nombre de chromosomes X peut-il contrôler ces gènes clés de la détermination du sexe ? Chez la drosophile, le mécanisme implique des interactions entre les produits de gènes appelés « numérateurs » portés sur le chromosome X et de gènes sur les autosomes, ainsi que des facteurs spécifiques maternels. Chez les femelles, les protéines produites en double quantité par les numérateurs, activent Sxl en se fixant sur les sites du promoteur P_e (voir Fig. 10.27), et surpassent la répression de Sxl exercée par des protéines codées à partir d'autosomes, ce qui se produit chez les mâles.



La voie schématisée dans la figure 10.26 est une simplification, dans la mesure où *dsx* ne contrôle pas tous les aspects de la différenciation sexuelle somatique de la drosophile. Il existe une branche supplémentaire à la voie de la différenciation sexuelle en aval de *tra*, qui contrôle les aspects du dimorphisme sexuel du système nerveux et du comportement sexuel. Celle-ci comporte le gène *fruitless*, dont l'activité a été montrée comme nécessaire pour le comportement sexuel du mâle.

Chez d'autres insectes diptères, la même stratégie générale pour la détermination du sexe est utilisée, mais il existe des différences marquées au niveau moléculaire. Seul *dsx* a été trouvé chez des diptères phylogénétiquement éloignés de la drosophile, et *Sxl* a été trouvé chez d'autres diptères mais n'est pas impliqué chez eux dans la détermination du sexe.

10.15 Le développement sexuel somatique chez *Caenorhabditis* est déterminé par le nombre de chromosomes X

Chez le nématode C. elegans, les deux sexes sont représentés par des hermaphrodites s'auto-fécondant (fondamentalement des femelles modifiées) et des mâles (Fig. 10.28), bien que chez les autres nématodes, s'observent des mâles et des femelles. Les hermaphrodites produisent une petite quantité de spermatozoïdes au début du développement, le restant des cellules germinales devenant des ovocytes. Le sexe chez C. elegans (et d'autres nématodes) est déterminé par le nombre de chromosomes X : l'hermaphrodite (XX) a deux chromosomes X, tandis que la présence d'un seul X conduit au développement d'un mâle (XO). Un des signaux primaires pour le développement d'un hermaphrodite est la protéine SEX-1, produite par un gène porté par le chromosome X, et qui est un élément clé dans l'évaluation du nombre de X présents. SEX-1 est un récepteur nucléaire d'hormone qui réprime le gène de détermination du sexe XO lethal (xol-1), aussi présent sur le X. En présence d'une double quantité de SEX-1 résultant de l'existence de deux chromosomes X, l'expression de xol-1 est inhibée, ce qui conduit au développement d'un hermaphrodite. Quand un seul X est présent, xol-1 s'exprime fortement et l'embryon se développe en mâle.

Une cascade d'activités géniques convertit le niveau d'expression de *xol-1* en un phénotype somatique sexuel (Fig. 10.29). Contrairement à la drosophile, la détermination du sexe de *C. elegans* nécessite des interactions cellulaires, avec au moins un des gènes impliqués codant une protéine de sécrétion. Au bout de cette cascade se situe le gène *transformer-1* (*tra-1*), qui code un facteur de transcription. L'expression de la protéine TRA-1 est nécessaire et suffisante pour diriger tous les aspects du développement des cellules somatiques hermaphrodites (XX). Un gain de fonction de *tra-1* permet le développement d'un individu XO en hermaphrodite, sans tenir compte des gènes régulateurs contrôlant normalement ses activités. Les mutations qui inactivent *tra-1* conduisent à une masculinisation complète des hermaphrodites XX.



Fig. 10.28 Hermaphrodite et mâle de *Caenorhabditis elegans*. L'hermaphrodite a une gonade « à deux bras » qui produit au départ des spermatozoïdes qui sont stockés dans les spermathèques. Les ovocytes, produits secondairement, sont fécondés de manière interne. Le mâle ne produit que des spermatozoïdes.

Fig. 10.29. Schéma de la voie de détermination du sexe somatique chez *Caenorhabditis elegans*. Le premier signal

de la détermination du sexe est dicté par le nombre de chromosomes X. Ouand ceux-ci sont au nombre de deux, l'expression du gène XO lethal (xol-1) est faible, conduisant au développement d'un hermaphrodite, tandis qu'une expression élevée conduit à un développement mâle. Une cascade d'expressions géniques à partir de xol-1 mène à l'expression du gène transformer-1 (tra-1) qui code un facteur de transcription. Si tra-1 est actif, un hermaphrodite se forme, mais si son niveau d'activité est bas, des mâles se développent. Le produit du gène hermaphrodite-1 (her-1) est une protéine de sécrétion, qui probablement se lie à un récepteur codé par transformer-2 (tra-2) en inhibant sa fonction.





10.16 La détermination sexuelle des cellules germinales dépend de la constitution génétique et de signaux intercellulaires

La détermination du sexe des cellules germinales, c'est-à-dire leur capacité à former des spermatozoïdes ou des ovules, est fortement influencée par les signaux que celles-ci reçoivent quand elles sont au sein des gonades. Chez la souris, par exemple, leur devenir est grandement déterminé par le sexe de la gonade où elles résident, mais non en fonction de leur propre constitution chromosomique. En fait, cette dernière et les signaux gonadiques coïncident presque toujours, mais il a été montré que des cellules germinales provenant d'embryons de souris mâle peuvent évoluer en ovocytes plutôt qu'en spermatozoïdes quand elles sont greffées dans des gonades embryonnaires femelles. L'inverse est également vrai.

Il existe une différence marquée dans le déroulement temporel de la méiose entre les mâles et les femelles de mammifères. Chez les embryons de souris mâles, les cellules germinales diploïdes cessent de se diviser lorsqu'elles entrent dans les gonades, et s'arrêtent en phase G1 du cycle cellulaire mitotique. Elles recommencent à proliférer après la naissance et entrent en méiose 7 à 8 jours après celle-ci. Chez les embryons femelles, les cellules germinales primordiales continuent à proliférer dans les quelques jours qui suivent leur colonisation des crêtes génitales (voir Sections 10.4 et 10.5). Après quelques cycles de division mitotique, elles entrent en prophase de première division de méiose et s'arrêtent à ce stade, en tant qu'ovocytes I, jusqu'au moment où la souris devient une femelle sexuellement mature, 9 semaines environ après la naissance. Dès lors, à chaque cycle reproductif, des ovocytes sélectionnés achèvent la première division de méiose et entament la seconde division (Fig. 10.30). La méiose ne s'achève qu'après la fécondation.

Bien que l'évolution des cellules germinales soit normalement fortement influencée par l'environnement dans lequel elles se trouvent, si les signaux externes habituels sont absents, elles semblent poursuivre une voie de différenciation qui leur est propre. Toutes les cellules germinales de souris entrent en méiose avant la naissance pour la lignée femelle alors qu'elles ne le feront qu'après la naissance pour la lignée mâle. Les cellules germinales, qu'elles soient XX ou XY, qui n'ont pas pu atteindre les crêtes génitales et se retrouvent dans des tissus voisins tels que les glandes surrénales embryonnaires ou le mésonéphros, entrent en méiose néanmoins et commencent à

Fig. 10.30 Le déroulement de la méiose dans les cellules germinales diffère

considérablement entre mâles et femelles chez les mammifères. En haut : des cellules germinales migrantes, XX ou XY, entrent en prophase de première division de méiose et deviennent des ovocytes, sauf si elles pénètrent dans un testicule. Dans celui-ci, les cellules reçoivent un signal inhibiteur qui bloque la division mitotique et évite leur entrée en méiose. En bas : chez la souris mâle après la naissance, dans le testicule, des spermatogonies immatures diploïdes entrent en méiose et l'achèvent en produisant des cellules germinales haploïdes qui se différencient au final en spermatozoïdes (à gauche). Chez les souris femelles après la naissance, les ovocytes entament la première division méiotique dans l'ovaire, mais son achèvement et l'entrée en seconde division de méiose ne s'effectuent qu'avec l'ovulation. La méiose n'est achevée qu'avec la fécondation.

évoluer en ovocytes indépendamment du sexe de l'embryon. Ainsi le sexe des cellules germinales semble être de type femelle par défaut. Des embryons de souris chimères XX/XY peuvent être réalisés en fusionnant des embryons mâles et femelles au stade quatre blastomères, et en raison de la présence d'un chromosome Y, des testicules se développent chez ces embryons chimères. Chez ces derniers, les cellules germinales XX, entourées par des cellules testiculaires s'engagent dans la spermatogenèse, mais les gamètes sont plus tard anormaux. Dans une souche particulière de souris Y/XX où se forment des ovaires plutôt que des testicules, des cellules germinales XY semblent se développer assez normalement en ovocytes mais ne peuvent poursuivre leur évolution après la fécondation, l'assemblage du fuseau de division ne s'effectuant pas correctement pour achever la deuxième division de méiose. Le fait qu'un transfert de noyaux d'ovocytes XY dans des ovocytes XX permet l'obtention de descendants sains, montre que les défauts observés dépendaient du cytoplasme XY.

Chez la drosophile, la différence de comportement entre les cellules germinales XY et XX est liée au départ au nombre de chromosomes X, comme pour les cellules somatiques. Le gène *Sxl* joue de nouveau un rôle important, bien que la plupart des autres facteurs intervenant dans la détermination du sexe puissent être différents de ceux présents dans les cellules somatiques. La constitution chromosomique et des interactions cellulaires sont impliquées dans le développement du phénotype sexuel des cellules germinales. La transplantation de cellules polaires marquées (voir Section 10.1) dans un embryon de sexe opposé montre que des cellules germinales mâles XY dans un embryon femelle XX s'intègrent dans les ovaires et commencent à se développer en spermatozoïdes, ce qui signifie que leur comportement est autonome et conforme à leur constitution génétique. Inversement, des cellules germinales XX dans un testicule essaient de se développer en spermatozoïdes, ce qui montre le rôle des signaux environnementaux. Dans aucun des cas, néanmoins, des spermatozoïdes fonctionnels sont produits.

L'hermaphrodite de *C. elegans* constitue un exemple particulièrement intéressant en ce qui concerne la différenciation des cellules germinales, les deux types de gamètes se développant au sein de la même gonade (Fig. 10.31). À la différence des cellules somatiques du nématode adulte dont le nombre et le lignage sont fixés (voir Section 6.1), le nombre de cellules germinales est indéterminé, avec environ un millier de cellules germinales dans chaque bras de la gonade. À l'éclosion, la larve ne contient que deux cellules germinales fondatrices qui en proliférant sont à l'origine des cellules de la lignée germinale. Ces dernières sont flanquées de chaque côté par des cellules distales qui contrôlent leur prolifération par un signal qui est la protéine LAG-2, homologue de Delta, le ligand de Notch. Le récepteur de LAG-2 sur les cellules germinales est GLP-1, similaire à LIN-2, impliqué chez le nématode dans la formation de la vulve (voir Section 6.8), et à Notch. GLP-1 a déjà été évoqué comme intervenant dans le devenir cellulaire chez les jeunes embryons (voir Section 6.4).

Chez *C. elegans*, l'entrée des cellules germinales en méiose à partir du troisième stade larvaire est contrôlée par le signal des cellules distales. En présence de ce signal, les cellules prolifèrent, mais au fur et à mesure qu'elles s'en éloignent, elles entrent en



Fig. 10.31 Détermination du sexe des cellules germinales dans la gonade hermaphrodite de *C. elegans*. En haut : au stade larvaire, les cellules germinales se multiplient dans une zone proche des extrémités distales de la gonade ; quand elles quittent cette zone, elles entrent en méiose et se développent en spermatozoïdes. En bas : chez l'adulte, les cellules qui quittent la zone de prolifération deviennent des ovocytes. Les ovocytes sont fécondés lors de leur passage dans l'utérus.

Illustration d'après Clifford, R., et al. : **Somatic control of germ cell development**. Semin. Dev. Biol 1994, **5** : 21-30. méiose et évoluent en spermatozoïdes (Fig. 10.31, schéma du haut). Dans la gonade hermaphrodite, si toutes les cellules qui sont au départ hors de portée du signal des cellules distales évoluent en spermatozoïdes, celles qui quittent ultérieurement la zone de prolifération et entrent en méiose, donnent des ovocytes (Voir Fig. 10.31, schéma du bas). Ceux-ci sont fécondés lors de leur passage dans l'utérus par les spermatozoïdes stockés. La gonade mâle possède des régions prolifératives similaires, mais toutes les cellules germinales évoluent en spermatozoïdes.

La détermination du sexe des cellules germinales chez le nématode est d'une certaine manière similaire à celle des cellules somatiques, en ce que l'équipement chromosomique constitue le facteur principal de la détermination et que beaucoup de gènes identiques sont impliqués dans les cascades d'expression génique. Les derniers gènes régulant la spermatogenèse sont appelés *fem* et *fog*. Chez les hermaphrodites, il doit exister un mécanisme pour activer les gènes *fem* dans certaines cellules XX, leur permettant d'évoluer en spermatozoïdes.

10.17 Des stratégies variées sont utilisées pour la compensation de dose des gènes liés au chromosome X

Chez toutes les espèces qui ont été considérées dans ce chapitre, un déséquilibre existe entre les sexes, pour les gènes liés à l'X. L'un des sexes a deux chromosomes X alors que l'autre n'en a qu'un. Cette inégalité doit être corrigée de manière à ce que soit assuré, dans les deux sexes, un même niveau d'expression pour les gènes portés par le chromosome X. Le mécanisme par lequel ce déséquilibre des gènes portés par le X est traité, est connu sous le terme de **compensation de dose**. La non-correction de ce déséquilibre se solde par des anomalies et un arrêt du développement. Les différentes espèces animales règlent ce problème de compensation de dose de diverses façons (Fig. 10.32).

Chez les mammifères, comme la souris ou l'espèce humaine, la compensation de dose est réalisée chez les femelles par l'inactivation d'un chromosome X dans chaque cellule après que le blastocyste s'est implanté dans la paroi utérine. Une fois que le chromosome X a été inactivé dans une cellule embryonnaire, celui-ci est maintenu



Fig. 10.32 Mécanismes de la compensation de dose. Chez les mammifères, la drosophile et *C. elegans*, il y a deux chromosomes X chez l'un des sexes et un seul chez l'autre. Les mammifères inactivent l'un des chromosomes X chez les femelles ; chez la drosophile mâle, l'unique chromosome X augmente son niveau de transcription ; chez *C. elegans*, il y a une diminution de la transcription du chromosome X chez les hermaphrodites. Le résultat de ces différents mécanismes de dosage de compensation est que la quantité de transcrits issus des chromosomes X est approximativement la même chez les mâles et les femelles.

inactif dans toutes les cellules somatiques et persiste sous cet état pendant toute la vie de l'individu (Fig. 10.33). Le chromosome X inactif est répliqué à chaque division cellulaire mais reste transcriptionnellement muet et sous un état physique différent de celui des autres chromosomes durant le restant du cycle cellulaire. En effet, si lors de la mitose, tous les chromosomes sont hautement condensés et que durant l'interphase, période entre deux divisions successives, les chromosomes se décondensent en longs filaments de **chromatine**, non visibles en microscopie optique, le chromosome inactif, lui, reste condensé et est visible dans les cellules humaines sous le nom de corpuscule de Barr (Fig. 10.34). Le choix du chromosome X inactivé dans une cellule semble dû au hasard, et donc les femelles de mammifères sont une mosaïque de cellules ayant des chromosomes X inactifs différents.

Le mosaïcisme lié à l'inactivation aléatoire d'un des X est parfois visible dans le pelage de femelles de mammifères. Une femelle hétérozygote pour une mutation d'un gène de pigmentation du pelage porté par le chromosome X, présente des taches colorées là où s'exprime dans des clones de cellules épidermiques le gène de pigmentation fonctionnel porté par le chromosome X non inactivé, le restant de l'épiderme étant constitué de cellules dont le chromosome X portant la version fonctionnelle du gène a été inactivé. La coloration écaille-de-tortue de la robe des chats est aussi due à un mosaïcisme lié au X. Ces chats possèdent deux allèles co-dominants, orange (X^{0}) et black (X^{B}), du principal gène de coloration de la robe localisé sur le chromosome X. Ces allèles produisent des pigments orange et noir, respectivement. Les gènes des pigments sont exprimés dans les mélanocytes qui dérivent des cellules des crêtes neurales ayant migré dans la peau. Les cellules chez lesquelles le chromosome portant X^o est inactivé expriment l'allèle X^B et vice versa. Chez les chats bicolores écaille-de-tortue (Fig. 10.35), les deux types de cellules sont mélangés, donnant une apparence tachetée caractéristique. Chez les chats calico possédant une robe tachetée de blanc, d'orange et de noir, le mélange cellulaire est moindre et de larges clones cellulaires d'une seule couleur se développent, qu'accompagnent des taches blanches dépourvues de pigment.

Comment les cellules comptent et choisissent leurs chromosomes pour les rendre inactifs n'est pas encore complètement compris. Mais le fait d'avoir trouvé que des cellules tétraploïdes n'ont que deux chromosomes actifs suggère que cela dépend des niveaux d'un signal produit par les chromosomes X eux-mêmes et d'un mécanisme de rétro-contrôle négatif entre autosomes et chromosomes X. Avant l'inactivation, les chromosomes X produisent un signal réceptionné par les autres chromosomes de la cellule. Quand tous les sites de réception sont occupés, les chromosomes autosomaux envoient en retour un signal qui peut atteindre et inactiver les chromosomes X. Le premier chromosome X à acquérir une masse critique de signal initie sa propre inactivation. La production du signal émanant du chromosome X est alors réduite, les autosomes cessent de produire le signal d'inactivation des X, ce qui fait qu'un seul chromosome X est inactivé par génome diploïde. Ce type de mécanisme peut également expliquer l'observation faite de longue date que des cellules diploïdes femelles ayant une formule de chromosomes sexuels anormale, tel que XXY ou XXXY, n'ont qu'un seul chromosome X actif par cellule somatique, tous les autres X étant inactivés.

L'inactivation de X est sous la dépendance d'une petite région chromosomique, le centre d'inactivation du X. Celui-ci contient beaucoup de gènes, dont celui d'un long ARN non codant, *Xist*, qui est le régulateur principal de l'inactivation du X, et celui d'un autre ARN non codant, *Tsix*, qui régule négativement *Xist*. Avant l'inactivation, les deux ARN sont faiblement transcrits par les deux chromosomes X. Puis l'expression de *Xist* s'accroît considérablement sur l'un ou l'autre des deux chromosomes X, alors qu'elle s'éteint sur l'autre. Le responsable de ce phénomène est encore inconnu, mais un candidat pourrait être le signal d'inactivation encore hypothétique provenant des autosomes évoqué précédemment. Une ubiquitine ligase, nommée aussi facteur de compétence, codée par un gène du chromosome X initie une augmentation de l'expression de *Xist* et pourrait être responsable de la détection du nombre de chromosomes présents dans la cellule et assurer qu'un seul X est inactivé dans une

Fig. 10.34 Chromosome X inactif (le corpuscule de Barr). La photographie montre le corpuscule de Barr (flèche) dans un noyau interphasique d'une cellule buccale d'une femme. *Photographie aimablement communiquée par J. Delhanty.*



Fig. 10.33 Transmission du chromosome X inactif. Chez les embryons précoces de mammifères femelles, l'un des deux chromosomes X, d'origine soit paternelle (Xp) soit maternelle (Xm), est inactivé au hasard. Dans la figure, Xp est inactivé et cette inactivation est maintenue au cours des nombreuses divisions cellulaires. Le chromosome inactif devient hautement condensé.

Illustration d'après Alberts, B. et al. : Molecular Biology of the Cell, 2nd edition. New York : Garland Publishing, 1989.





Fig. 10.35 La coloration écaille-de-tortue de la robe du chat est due au mosaïcisme d'allèles liés à l'X consécutif à l'inactivation du chromosome X.

Foxfire, photographie aimablement communiquée par Bruce Goatly.

cellule diploïde femelle. La totalité du chromosome X est recouverte par les transcrits *Xist* qui, en se déployant depuis leur lieu de synthèse, bloquent la transcription de gènes du X, dont celle de *Tsix*, et rendent inactif le chromosome. Sur le chromosome non inactivé, *Tsix* demeure actif pendant un petit peu de temps, mais rapidement après l'inactivation complète du X, *Xist* et *Tsix* cessent tous deux de s'exprimer sur le chromosome actif. L'ARN *Xist* continue à maintenir inactif l'autre chromosome durant les divisions cellulaires successives. Celui-ci a un profil de méthylation différent du X actif, ce qui favorise probablement le maintien de son inactivité. La méthylation de l'ADN est l'un des mécanismes utilisés chez les mammifères pour réprimer l'expression génique à long terme, et il a été décrit précédemment comment il pouvait contribuer à l'empreinte différentielle des gènes paternels et maternels dans la lignée germinale (voir Section 10.8). La méthylation de l'ADN et d'autres mécanismes épigé-nétiques contrôlant l'expression génique sont discutés plus en détail dans l'Encart 8A.

La compensation de dose chez la drosophile se manifeste de manière différente de celles des souris et de l'espèce humaine (voir Fig. 10.32). Au lieu d'une répression de l'activité du X surnuméraire chez les femelles, la transcription des gènes du chromosome X chez les mâles est presque doublée. Un ensemble de gènes spécifiques mâles, le complexe MSL, contrôle majoritairement la compensation de dose et son expression est réprimée chez les femelles par la protéine Sxl, prévenant ainsi une transcription excessive sur le chromosome X. L'augmentation d'activité chez les mâles est régulée par le signal primaire de détermination du sexe, qui se solde par un mécanisme opérationnel de compensation de dose quand *Sxl* est éteint. Chez les femelles où s'exprime *Sxl*, ce mécanisme n'a pas lieu. Comme chez la souris, ce dernier implique des ARN non codants.

Chez *C. elegans*, la compensation de dose est réalisée en réduisant le niveau d'expression d'un chromosome X chez les individus XX au niveau de celui de l'unique chromosome X des mâles XO (voir Fig. 10.32). Le nombre de chromosomes X est

RÉSUMÉ

Le développement précoce des embryons est très semblable dans les deux sexes. Un signal primaire de détermination du sexe déclenche le développement vers l'un ou l'autre sexe, et chez les mammifères, la drosophile et C. elegans, ce signal est déterminé par la constitution chromosomique des œufs fécondés. Chez les mammifères, c'est le gène Sry porté par le chromosome Y qui est responsable du développement de la gonade embryonnaire en testicule et de la production d'hormones qui déterminent les caractères sexuels mâles. Le phénotype sexuel des cellules somatiques est déterminé par les hormones gonadiques. Chez C. elegans et la drosophile, le signal de la détermination du sexe est le nombre de chromosomes X. Chez la drosophile, en réponse à ce signal, le gène Sex-lethal s'exprime chez les femelles mais non chez les mâles. Dans les deux cas, se réalise par la suite une activité génique dans laquelle un épissage d'ARN sexe-spécifique est impliqué. Chez C. elegans, le niveau d'activité du gène XO lethal est bas chez les hermaphrodites et élevé chez les mâles conduisant au final à une expression sexe-spécifique du gène transformer-1, qui détermine le phénotype sexuel. La différenciation somatique sexuelle chez la drosophile est autonome au niveau cellulaire et est contrôlée par le nombre de chromosomes X. Chez C. elegans des interactions cellules-cellules sont aussi impliquées. Chez les mammifères, des signaux en provenance des gonades déterminent l'évolution des cellules germinales en ovules ou en spermatozoïdes. Les cellules germinales mâles chez la drosophile suivent la voie de la spermatogenèse, même dans un ovaire, voie suivie également par les cellules germinales femelles quand elles sont placées dans un testicule. La plupart des individus adultes de C. elegans sont hermaphrodites, et produisent dans une même gonade des spermatozoïdes et des ovocytes.

Diverses stratégies de compensation de dose sont utilisées pour corriger le déséquilibre des chromosomes X entre les mâles et les femelles. Chez les femelles mammifères, un des chromosomes X est inactivé. Chez les drosophiles mâles, l'activité de l'unique chromosome X est régulée à la hausse, et chez *C. elegans*, l'activité des chromosomes X des hermaphrodites XX est régulée à la baisse pour égaler celle de l'unique chromosome X des mâles. déterminé par un ensemble de gènes liés au X qui peuvent réprimer l'expression du gène maître *xol-1*. Un événement clé dans l'initiation du dosage de compensation chez le nématode est l'expression de la protéine SDC-2, qui se produit seulement chez les hermaphrodites. Elle forme un complexe spécifiquement avec le chromosome X et déclenche l'assemblage d'un complexe protéique appelé complexe de compensation de dose qui se fixe à une région particulière du chromosome X et réduit la transcription.



Résumé du Chapitre 10

- Chez de nombreuses espèces animales, les futures cellules germinales sont spécifiées par des déterminants cytoplasmiques localisés dans l'ovule. Les cellules germinales des mammifères sont atypiques dans la mesure où elles sont entièrement spécifiées par des interactions cellules-cellules.
- Chez les animaux, la capacité des cellules germinales à former des spermatozoïdes ou des ovules dépend à la fois de la constitution chromosomique et d'interactions avec les cellules de la gonade.

- Lors de la fécondation, la fusion entre le spermatozoïde et l'ovule initie le développement, et des mécanismes existent pour assurer la pénétration que d'un seul spermatozoïde dans l'ovule.
- Chez les mammifères, les deux génomes maternel et paternel sont nécessaires pour que se réalise un développement normal en raison de l'empreinte subie par certains gènes. L'expression ou non de ces gènes durant le développement, est dépendante de leur origine, c'est-à-dire d'un spermatozoïde ou d'un ovule.
- Chez beaucoup d'animaux, la constitution chromosomique de l'embryon détermine son sexe. Chez les mammifères, le chromosome Y détermine le sexe mâle ; il spécifie le développement des testicules et les hormones produites par ces derniers sont à l'origine des caractères sexuels mâles. En l'absence de chromosome Y, l'embryon se développe en femelle.
- Chez la drosophile et *C. elegans*, le développement sexuel est au départ déterminé par le nombre de chromosomes X, à l'origine d'une cascade d'activités géniques. Chez les mouches, la différenciation sexuelle somatique est autonome au niveau cellulaire et chez les nématodes, le phénotype somatique sexuel est déterminé par des interactions entre les cellules.
- Les animaux utilisent des stratégies variées de compensation de dose pour corriger le déséquilibre du nombre de chromosomes X entre individus mâles et femelles.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Faire la distinction entre lignée germinale, gamètes et cellules somatiques. De quelles fonctions clés les cellules germinales sont-elles responsables ?

2. Résumer les preuves de l'existence d'un plasme germinal spécial chez la drosophile et le xénope. La présence de ce dernier est-elle un fait universel du développement animal ?

3. Tracer une vue schématique de deux générations de drosophile : partir d'un mâle et d'une femelle, chacun d'eux étant hétérozygote pour une mutation récessive de perte de fonction *d'oskar*. Les accoupler pour obtenir des mâles et femelles homozygotes pour *oskar*. Accoupler ces mutants *oskar* à des mouches de type sauvage. En quoi ces accouplements illustrent-ils la raison pour laquelle de telles mutations sont qualifiées de « sans petit-enfant » ? Est-il important de savoir si le mutant homozygote pour la mutation d'*oskar* est un mâle ou une femelle ? Expliquer.

4. Quel est le rôle de SDF-1/CXCR4 dans la migration des cellules germinales ? Quelle est son importance chez les vertébrés ?

5. Discuter les aspects suivants de la méiose ; (1) Pourquoi la « division réductionnelle » (division I de méiose) est-elle importante ? (2) Quelle est la signification de la recombinaison dans la reproduction sexuée ? (3) Pourquoi quatre spermatozoïdes sont-ils produits à partir de chaque cellule s'engageant en méiose lors de la spermatogenèse alors qu'un seul ovotide est formé à l'issue de l'ovogenèse ? Que sont devenues les autres cellules ?

6. Quand les ovocytes primaires se forment-ils lors du développement humain ? Que se passe-t-il chez un ovocyte primaire depuis sa formation jusqu'à sa maturation en ovule prêt à être fécondé ? À quel stade de la méiose l'ovocyte se trouve-t-il au moment de la fécondation ?

7. Que signifie « empreinte génomique » ? Quels sont les mécanismes qui maintiennent une empreinte ?

8. Décrire le processus par lequel le contenu d'un spermatozoïde, dont son noyau, pénètre dans l'ovule chez les mammifères. Inclure SED1, ZP2 et les enzymes acrosomiques dans la réponse.

9. La fécondation de l'œuf d'oursin provoque une onde calcique qui se propage à travers l'ensemble de la cellule. Le calcium est-il d'origine extra- ou intracellulaire ? Quelles sont les deux conséquences de cette augmentation de la concentration de calcium ?

10. Qu'est-ce que le MPF ? Résumer le rôle des complexes du type MPF dans le contrôle des différentes phases du cycle cellulaire.

11. Expliquer comment des anomalies chromosomiques peuvent être utilisées comme preuve des affirmations suivantes. (1) La détermination du sexe mâle dans l'espèce humaine est contrôlée par la présence d'un chromosome Y et non par deux chromosomes X. (2) La détermination du sexe femelle chez la drosophile est contrôlée par la présence de deux chromosomes X et non par la présence d'un chromosome Y. (3) Un seul chromosome X est suffisant chez l'espèce humaine à déterminer le sexe femelle. (4) Un seul chromosome X est suffisant pour déterminer le sexe mâle chez la drosophile. (5) *SRY* est le gène responsable de la détermination du sexe mâle chez l'espèce humaine.

12. Comment *SRY* déclenche-t-il le développement mâle chez les mammifères ? Inclure Sox9, les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig, l'hormone anti-müllérienne, et la testostérone dans la réponse.

13. Résumer le développement des gonades et des structures associées chez les mammifères, en se focalisant sur les canaux de Wolff et de Müller.

14. Résumer les informations présentées dans les Figs 10.26 et 10.27 à propos de la différenciation sexuelle autonome des cellules qui se réalise chez la drosophile. Ne pas simplement recopier les deux figures, mais à la place, incorporer l'ensemble des informations dans un seul schéma récapitulatif.

15. Qu'y a-t-il de différent concernant les sexes de *C. elegans* comparés à ceux des autres modèles animaux ? Comment cela affecte-t-il la méthode de reproduction ?

16. Comparer brièvement et opposer les voies de la détermination du sexe chez la drosophile et *C. elegans*. Existe-t-il des similitudes dans les stratégies utilisées ? Sont-ce les mécanismes impliqués qui créent les différences ?

17. Dire comment l'inactivation du chromosome X réalisera une compensation de dose chez l'espèce humaine avec les compositions chromosomiques XY, XX, XXY, ou XXX.

18. Comment *Xist* contrôle-t-il l'inactivation du chromosome X chez les mammifères ? Imaginer pour quelles raisons l'autre gène impliqué dans ce processus, *Tsix*, a reçu ce nom.

QCM

- **N.B.** Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.
- **1.** Le plasme germinal chez la drosophile est spécifié par
- a) *bicoïd*
- b) des gènes Hox
- c) oskar
- d) le point d'entrée du spermatozoïde

2. Chez les souris, les cellules germinales peuvent être initialement identifiées

- a) comme étant les cellules exprimant *Blimp1* dans le mésoderme présomptif de l'épiblaste proximal
- b) dans le mésoderme qui formera le tissu gonadique
- c) comme étant les cellules contenant le plasme polaire de l'extrémité postérieure de l'embryon
- d) comme étant les cellules exprimant *Oct-4* dans les crêtes génitales

3. Quel fait dans la méiose, comparativement à la mitose, est le plus important pour la formation des gamètes ?

- a) Les chromosomes homologues se séparent lors de la division I de méiose alors que les chromatides sœurs se séparent à la mitose.
- b) La méiose conduit à la production d'éléments haploïdes alors que la mitose conduit à des cellules filles diploïdes.
- c) La méiose permet la possibilité d'une recombinaison, alors que la mitose non.
- d) Typiquement trois des quatre produits ne deviennent pas des ovocytes au cours de la méiose chez les individus femelles, alors que la mitose produira quatre produits fonctionnels à l'issue de deux cycles de division.

4. À quel stade de quel type de division cellulaire, l'ovocyte de mammifère se trouve-t-il à la naissance de l'animal ?

- a) en G1 du cycle cellulaire mitotique.
- b) en métaphase de division II de méiose.
- c) en prophase de division I de méiose.
- d) en prophase de mitose.
- 5. Qu'est-ce que la zone pellucide d'un ovule de mammifère ?
- a) Une membrane rigidifiée qui forme une structure physique bloquant la polyspermie, formée à partir de la membrane vitelline et du contenu des granules corticaux
- b) Une couche de cellules folliculaires de la corona radiata
- c) Une couche extracellulaire de glycoprotéines
- d) La membrane plasmique de l'œuf
- **6.** L'oviducte de mammifère provient
- a) du mésonéphros
- b) du canal de Müller
- c) de l'uretère
- d) du canal de Wolff
- 7. L'activité moléculaire de la protéine Sxl de drosophile est
- a) comme celle d'un « numérateur » comptant le nombre de chromosomes X

- b) comme celle d'un facteur de transcription
- c) de contrôler l'épissage d'ARN
- d) de constituer un signal pour le récepteur de Tra

8. Le syndrome d'Angelman, maladie congénitale humaine, est dû à la transmission d'un chromosome 15 maternel ayant subi une petite délétion dans une région particulière. Pourquoi cette délétion ne se comporte-t-elle pas comme un allèle récessif, c'est-à-dire pourquoi n'est-elle pas surpassée par la région intacte du chromosome 15 paternel non muté ?

- a) les chromosomes porteurs de délétions n'ont pas un comportement correct lors d'une mitose, ce qui donne, lors des divisions cellulaires chez l'embryon, des cellules ayant un nombre anormal de chromosomes et qui ne participent pas correctement au développement de l'individu.
- b) La copie paternelle du chromosome 15 possède des gènes dans la région délétée qui sont sous empreinte, et ainsi inactifs. En absence d'une quelconque copie active de ces gènes, un développement ne peut pas se dérouler normalement.
- c) Les gènes présents sur cette partie du chromosome 15 sont spéciaux dans le fait qu'ils nécessitent d'être en double exemplaire pour un développement normal, et la perte de l'un des deux lots ne permet pas un développement normal.
- d) Deux copies de chaque gène dans le génome sont nécessaires pour le développement, et la perte de l'une d'entre elles dans cette région perturbe le développement.

9. À quoi correspond la réaction corticale des œufs d'oursin et pourquoi est-elle importante ?

- a) C'est la dépolarisation de la membrane plasmique suite à la pénétration du spermatozoïde, qui aide à bloquer la polyspermie.
- b) C'est l'entrée d'ions Ca²⁺ dans l'œuf *via* le cortex, qui initie le développement.
- c) C'est la fusion du cortex de l'œuf avec la membrane plasmique, ce qui permet la pénétration du spermatozoïde.
- d) C'est la libération du contenu des granules corticaux après l'entrée du spermatozoïde, qui transforme la membrane vitelline en membrane de fécondation, qui bloque la polyspermie.

10. À quelle protéine de signalisation de mammifères la protéine GLP-1 de *C. elegans* est-elle similaire ?

- a) BMP
- b) Delta
- c) Notch
- d) Récepteur de la testostérone

Réponses aux QCM

1:c, 2:a, 3:b, 4:c, 5:c, 6:b, 7:c, 8:b, 9:d, 10:c.

Références bibliographiques générales

Chadwick, D., Goode, J. : *The Genetics and Biology of Sex Determination 2002.* Novartis Foundation Symposium 244. New York : John Wiley, 2002.

- Cinalli, R.M., Rangan, P., Lehman, R. : Germ cells are forever. *Cell* 2008, **132** : 559–562.
- Crews, D. : Animal sexuality. Sci. Am. 1994, 270 : 109–114.
- Zarkower, D. : Establishing sexual dimorphism : conservation amidst diversity ? *Nat. Rev. Genet.* 2001, 2 : 175–185.

Références bibliographiques spécifiques

10.1 Les cellules germinales sont spécifiées chez certains embryons par la présence d'un plasme germinal dans l'ovule

- Extavour, C.G., Akam, M. : Mechanisms of germ cell specification across the metazoans : epigenesis and preformation. *Development* 2003, **130** : 5869–5884.
- Matova, N., Cooley, L. : **Comparative aspects of animal oogenesis**. *Dev. Biol.* 2001, **231** : 291–320.
- Mello, C.C., Schubert, C., Draper, B., Zhang, W., Lobel, R., Priess, J.R. : The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* 1996, **382** : 710–712.
- Micklem, D.R., Adams, J., Grunert, S., St. Johnston, D. : Distinct roles of two conserved Staufen domains in *oskar* mRNA localisation and translation. *EMBO J.* 2000, 19 : 1366–1377.
- Ray, E. : **Primordial germ-cell development : the zebrafish perspective.** *Nat. Rev. Genet.* 2003, **4 :** 690–700.
- Williamson, A., Lehmann, R. : Germ cell development in Drosophila. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1996, 12 : 365–391.

10.2 Chez les mammifères, les cellules germinales sont induites par des interactions intercellulaires au cours du développement

- Magnusdottir, E., Surani, M.A. : How to make a primordial germ cell. *Development* 2014, 141 : 245–252.
- McLaren, A. : **Primordial germ cells in the mouse**. *Dev. Biol.* 2003, **262 :** 1–15.
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., Surani, M.A. : Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005, 436 : 207–213.

10.3 Les cellules germinales migrent depuis leur site d'origine jusqu'aux gonades & 10.4 Les cellules germinales sont guidées vers leur destination finale par des signaux chimiques

Deshpande, G., Zhou, K., Wan, J.Y., Friedrich, J., Jourjine, N., Smith, D., Schedl, P. : **The** *hedgehog* **pathway gene** *shifted* **functions together with the** *hmgcr*-**dependent isoprenoid biosynthetic pathway to orchestrate germ cell migration**. *PLoS Genet*. 2013, **9** : e1003720.

Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Koprunner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., Raz, E. : Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 2002, 111 : 647–659.

- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., Nusslein-Volhard, C., Tubingen 2000 Screen Consortium : A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 2003, 421 : 279–282.
- Richardson, B.E., Lehmann, R. : Mechanisms guiding primordial germ cell migration : strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010, **11** : 37–49.
- Weidinger, G., Wolke, U., Köprunner, M., Thisse, C., Thisse,
 B., Raz, E. : Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. Development 2002, 129 : 25–36.

10.5 La différenciation des cellules germinales implique une réduction de moitié du nombre de chromosomes par la méiose

De Rooij, D.G., Grootegoed, J.A. : **Spermatogonial stem cells**. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998, **10 :** 694–701.

- Hultén, M.A., Patel, S.D., Tankimanova, M., Westgren, M., Papadogiannakis, N., Jonsson, A.M., Iwarsson, E. : The origins of trisomy 21 Down syndrome. *Mol. Cytogenet*. 2008, 1: 21–31.
- Mehlmann, L.M. : Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005, 1 :0: 791–799.
- Pacchierottia, F., Adler, I.-D., Eichenlaub-Ritter, U., Mailhes, J.B. : Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environ. Res.* 2007, **104** : 46–69.
- Vogta, E., Kirsch-Volders, M., Parry, J., Eichenlaub-Rittera, U. : Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat. Res.* 2008, 651 : 14–29.

10.6 Le développement d'un ovocyte peut impliquer une amplification génique et des apports de la part d'autres cellules

Browder, L.W. : *Oogenesis*. New York : Plenum Press, 1985. Choo, S., Heinrich, B., Betley, J.N., Chen, A., Deshler, J.O. :

Evidence for common machinery utilized by the early and late RNA localization pathways in *Xenopus* **oocytes**. *Dev. Biol.* 2004, **278 :** 103–117.

10.7 Des facteurs cytoplasmiques sont responsables du maintien des potentialités ovocytaires

Gurdon, J.B. : Nuclear transplantation in eggs and oocytes. *J. Cell Sci. Suppl.* 1986, **4 :** 287–318.

10.8 Chez les mammifères certains gènes contrôlant la croissance embryonnaire sont sous « empreinte »

Bartolomei, M.S : Genomic imprinting : employing and avoiding epigenetic processes. *Genes Dev.* 2009, **23** : 2124–2133.

Plasschaert, R.N., Bartolomei, M.S. : Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. *Development* 2014, 141 : 1805–1813.

- Reik, W., Walter, J. : Genomic imprinting : parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2001, **2**: 21–32.
- Wood, A.J., Oakey, R.J. : Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *PLoS Genet*. 2006, 2 : e147.

10.9 La fécondation fait intervenir des interactions de surface entre les gamètes

Avella, M.A., Xiong, B., Dean, J. : The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Mol Hum Reprod.* 2013; 19: 279–289.

Baibakov, B., Boggs, N.A., Yauger, B., Baibakov, G., Dean, J. : Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *J Cell Biol.* 2012, **197 :** 897–905.

Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., Wright, G.J. : **Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization**. *Nature* 2014, **508 :** 483–487. Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., Yanagimachi, R. : Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2011, 108 : 20008–20011.

10.10 Des modifications de la membrane plasmique et des enveloppes de l'ovule bloquent la polyspermie lors de la fécondation

- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., Wright, G.J. : Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 2014, **508** : 483–487.
- Burkart A.D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M., Dean, J. : Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol.* 2012, 197 : 37–44.
- Wong, J.L., Wessel, G.M. : Defending the zygote : search for the ancestral animal block to polyspermy. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2006, **72** : 1–151.

10.11 La fusion ovule-spermatozoïde provoque une onde calcique à l'origine de l'activation de l'œuf

- Kashir, J., Nomikos, M., Lai, F. A., Swann, K. : Sperminduced Ca²⁺ release during egg activation in mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, pii : S0006-291X(14)00729-3.
- Suzuki, T., Yoshida, N., Suzuki, E., Okuda, E., Perry, A.C. : Fullterm mouse development by abolishing Zn²⁺-dependent metaphase II arrest without Ca²⁺ release. *Development* 2010, 137 : 2659–2669.
- Whitaker, M. : Calcium signaling in early embryos. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2008, **363 :** 1401–1418.

10.12 Le principal gène de détermination du sexe est sur le chromosome Y chez les mammifères

- Capel, B. : The battle of the sexes. *Mech. Dev.* 2000, **92** : 89–103. Koopman, P. : The genetics and biology of vertebrate sex determination. *Cell* 2001, **105** : 843–847.
- Schafer, A.J., Goodfellow, P.N. : Sex determination in humans. *BioEssays* 1996, **18** : 955–963.

10.13 Le phénotype sexuel des mammifères est régulé par des hormones gonadiques

Jameson, S.A., Lin, Y.T., Capel, B. : Testis development requires the repression of Wnt4 signaling by Fgf9 signaling. *Dev Biol.* 2012, **370** : 24–32.

Svingen, T., Koopman, P. : Building the mammalian testis : origins, differentiation and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 2013, **27** : 2409–2426.

Swain, A., Lovell-Badge, R. : Mammalian sex determination : a molecular drama. *Genes Dev.* 1999, **13** : 755–767.

Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., McMahon, A.P. : Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999, 397 : 405–409.

10.14 La détermination du sexe a pour premier signal le nombre de chromosomes X chez la drosophile et est autonome au niveau cellulaire

Brennan, J., Capel, B. : **One tissue, two fates : molecular genetic events that underlie testis versus ovary development**. *Nat. Rev. Genet.* 2004, **5 :** 509–520.

- Hodgkin, J. : Sex determination compared in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Nature* 1990, **344** : 721–728.
- MacLaughlin, D.T., Donahoe, M.D. : Sex determination and differentiation. New Engl. J. Med. 2004, 350 : 367–378.

10.15 Le développement sexuel somatique chez *Caenorhabditis* est déterminé par le nombre de chromosomes X

Carmi, I., Meyer, B.J. : The primary sex determination signal of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **152** : 999–1015.

Meyer, B. J. : **X-chromosome dosage compensation**. In WormBook (June 25, 2005) (edited by The C. elegans Research Community). doi/10.1895/wormbook.1.8.1, http://www. wormbook.org (date accessed 21 May 2010).

Raymond, C.S., Shamu, C.E., Shen, M.M., Seifert, K.J., Hirsch, B., Hodgkin, J., Zarkower, D. : Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 1998, 391 : 691–695.

10.16 La détermination sexuelle des cellules germinales dépend de la constitution génétique et de signaux intercellulaires

Childs, A.J., Saunders, P.T.K., Anderson, R.A. : Modelling germ cell development *in vitro*. *Mol. Hum. Reprod.* 2008, 14 : 501–511.

McLaren, A. : Signaling for germ cells. Genes Dev. 1999, 13 : 373–376.

Obata, Y., Villemure, M., Kono, T., Taketo, T. : **Transmission of Y chromosomes from XY female mice was made possible by the replacement of cytoplasm during oocyte maturation**. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008, **105** : 13918–13923.

Seydoux, G., Strome, S. : Launching the germline in *Caenorhabditis* elegans : regulation of gene expression in early germ cells. *Development* 1999, **126** : 3275–3283.

10.17 Des stratégies variées sont utilisées pour la compensation de dose des gènes liés au chromosome X

Avner, P., Heard, E. : X-chromosomes inactivation : counting, choice and initiation. Nat. Rev. Genet. 2001, 2 : 59–67.

Csankovszki, G., McDonel, P., Meyer, B.J. : Recruitment and spreading of the *C. elegans* dosage compensation complex along X chromosomes. *Science* 2004, 303 : 1182–1185.

Navarro, P., Avner, P. : An embryonic story : analysis of the gene regulative network controlling Xist expression in mouse embryonic stem cells. *Bioessays*, 2010, **32** : 581–588

Panning, B. : X-chromosome inactivation: the molecular basis of silencing. J. Biol. 2008, 7: 30.

Pollex, T., Heard, E. : Recent advances in X-chromosome inactivation research. Curr. Opin. Cell Biol. 2012, 24: 825–832.

Starmer, J., Magnuson, T. : New model for random X chromosome inactivation. *Development* 2009, **136**: 1–10.

11



Organogenèse

- Le membre des vertébrés
- Les pattes et les ailes des insectes
- Les yeux des insectes et des vertébrés
- Les poumons des vertébrés et les trachées des insectes
- Le cœur et les vaisseaux sanguins des vertébrés
- Les dents

Une fois le plan d'organisation de l'animal mis en place, le développement d'une grande variété d'organes débute. La position des organes a déjà été définie lors de la mise en place du plan d'organisation du corps, mais la suite de leur développement se fera de manière largement autonome. L'organogenèse dépend de mécanismes qui sont similaires à ceux utilisés lors du développement précoce, par exemple l'information de position ou la migration cellulaire, et les mêmes voies de signalisation cellulaire seront utilisées de manière répétée. L'organogenèse est néanmoins plus complexe que le développement précoce et implique un plus grand nombre de gènes car les organes sont composés de plusieurs types de tissus dont le développement doit être coordonné.

Jusqu'à présent, il a été principalement abordé les aspects du développement impliqués dans la mise en place du plan d'organisation du corps, ainsi que la morphogenèse et la différenciation cellulaire précoces chez différents organismes. L'intérêt sera porté ici au développement d'organes spécifiques, l'**organogenèse**, qui est une étape cruciale du développement permettant à l'embryon de devenir un organisme fonctionnel et autonome.

Le développement de certains organes a été étudié de manière très détaillée et ces organes constituent d'excellents modèles pour étudier des processus du développement tels l'induction, les changements de forme, la mise en place d'informations de position et la différenciation cellulaire. Dans ce chapitre, seront abordés tout d'abord le développement des membres et celui des yeux chez les vertébrés et la drosophile. Sera considéré ensuite le cas de certains organes internes dont la structure de base est fondamentalement tubulaire, notamment les poumons, le cœur (qui se forme à partir d'un tube de mésoderme) et le système vasculaire, et examiné les différentes manières dont des tubes anatomiques peuvent se former. Le développement du rein, qui a lui aussi une structure tubulaire, sera abordé dans le matériel complémentaire associé à ce chapitre, qui se trouve sur le site internet compagnon de ce livre.

Finalement, la formation des dents et la mise en place de l'organisation de la denture seront également étudiées. Le développement du tube digestif ou d'autres organes majeurs, comme le foie et le pancréas, ne sera pas abordé, car leur développement repose sur des principes de développement similaires à ceux des autres organes étudiés. Certains aspects du développement du foie, ayant trait à la croissance et la régénération de cet organe, seront discutés dans le Chapitre 13.



Informations supplémentaires concernant le développement du rein
Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'organogenèse sont essentiellement similaires à ceux rencontrés lors des stades plus précoces du développement. On retrouvera également de nombreux gènes et molécules de signalisation mentionnés dans les chapitres précédents. Néanmoins les mécanismes impliqués dans l'organogenèse sont globalement plus complexes que ceux du développement précoce et même si on retrouve un certain nombre de principes généraux, telle que l'information de position, il existe de nombreux détails rendant spécifiques certains aspects du développement d'un organe particulier.

Le membre des vertébrés

Le membre des vertébrés constitue un excellent modèle pour identifier et caractériser des principes généraux du développement. Le développement du membre implique en effet des changements basiques de forme et son organisation est initialement relativement simple et facilement reconnaissable. Le membre est aussi un bon modèle pour étudier le rôle des interactions entre cellules et de la signalisation cellulaire dans le développement d'une structure contenant un grand nombre de cellules. Certains aspects du développement du membre sont étudiés chez la souris, principalement grâce à l'étude de mutants spontanés ou de souris knock-out. Les principes de bases du développement du membre ont néanmoins été établis et le plus étudiés chez le poulet chez lequel la microchirurgie des membres en développement est possible. Une fenêtre est faite dans la coquille de l'œuf et les bourgeons de membre sont expérimentalement modifiés, alors que l'embryon reste dans l'œuf (Fig. 3.35). Après l'acte chirurgical, la fenêtre est rescellée et l'embryon poursuit son développement, ce qui permet d'étudier les effets de cet acte sur le développement du membre. Le développement précoce des bourgeons des nageoires pectorales chez le poisson-zèbre, très similaire à celui des bourgeons de membre des tétrapodes, est également de plus en plus étudié.

Chez les embryons de poulet, les premiers signes du développement des membres sont visibles après environ trois jours d'incubation, à un moment où les principales structures corporelles le long de l'axe antéro-postérieur sont déjà bien établies. Des petites protubérances, les **bourgeons de membre**, se forment à partir des flancs de l'embryon (Fig. 11.1). Après dix jours d'incubation, l'organisation générale du membre est en place et les différentes pièces squelettiques sont formées (Fig. 11.12). Ces pièces initialement cartilagineuses sont ensuite remplacées par de l'os (Section 13.9 pour des détails sur la croissance des os). À ce stade, les bourgeons des plumes sont présents et le membre possède des muscles ainsi que des tendons. Le membre présente trois axes de polarité : un **axe proximo-distal** qui va de la base du membre (près du corps) vers son extrémité (loin du corps) ; un **axe antéro-postérieur** parallèle à celui du corps (chez l'espèce humaine cet axe va du pouce, antérieur, vers le petit doigt, postérieur, et chez le poulet du doigt 2 vers le doigt 4) ; un **axe dorso-ventral** qui chez l'espèce humaine va du dos de la main vers la paume.

11.1 Le membre des vertébrés se forme à partir d'un bourgeon de membre

Le bourgeon de membre précoce est composé d'un cœur de cellules mésenchymateuses recouvert d'une couche de cellules épithéliales (Fig. 11.3). Les cellules mésenchymateuses qui produisent le squelette et les tissus conjonctifs du membre proviennent du mésoderme des lames latérales, alors que celles qui produisent les cellules musculaires proviennent des somites (Section 5.13). Les vaisseaux sanguins du membre sont formés, au moins en partie, par des cellules dérivant également des somites. Les cellules épithéliales du bourgeon de membre proviennent quant à elles de l'ectoderme et produisent l'épiderme cutané du membre (Section 8.10).

À l'extrémité du bourgeon de membre se trouve un épaississement de l'ectoderme, la **crête apicale ectodermique** (ou AER pour *Apical Ectodermal Ridge*) qui se situe le long de la frontière entre l'ectoderme dorsal et ventral (Fig. 11.4). Juste sous l'AER se trouve une région de cellules mésenchymateuses indifférenciées dont la prolifération



Fig. 11.1 Les bourgeons de membre de l'embryon de poulet. Les bourgeons de membre se forment sur les flancs de l'embryon après environ trois jours d'incubation de l'œuf après la ponte. Seuls les bourgeons de membre du côté droit sont représentés sur la figure. Ils sont composés de mésoderme entouré d'ectoderme. À l'extrémité de chaque bourgeon se trouve un épaississement de l'ectoderme appelé crête apicale ectodermique (AER). Fig. 11.2 L'aile de l'embryon de poulet. La photographie montre une préparation *in toto* d'une aile d'un embryon de poulet après 10 jours d'incubation. L'aile a été colorée pour montrer la disposition des éléments cartilagineux différenciés. À ce stade, les principaux éléments squelettiques (notamment l'humérus, le radius et l'ulna) sont formés, mais sont encore constitués de cartilage, Leur ossification se produisant plus tardivement. Les muscles et les tendons sont également bien développés à ce stade, mais ne peuvent pas être vus sur ce genre de préparation. Des bourgeons de plume peuvent également être observés, particulièrement à la limite postérieure de l'aile. Les trois axes du membre sont l'axe proximo-distal, l'axe antéro-postérieur et l'axe dorso-ventral (en haut). Il faut noter que l'aile du poulet ne comporte que trois doigts, traditionnellement appelés doigts 2, 3 et 4 (en référence aux cinq doigts du membre typique des tétrapodes), même si des analyses récentes les identifient comme les doigts 1, 2 et 3 (voir Chapitre 14). Dans tout le chapitre, sera conservée la numérotation traditionnelle des doigts vu que c'est celle la plus utilisée dans la littérature. Barre ďéchelle = 1 mm.



Fig. 11.3 Coupe transversale d'un bourgeon de membre de l'embryon de poulet. La crête apicale ectodermique (AER) se trouve à l'extrémité du bourgeon. Sous l'AER se trouve une région de cellules indifférenciées. En position proximale par rapport à cette région, les cellules mésenchymateuses se condensent et se différencient en cartilage. Des cellules musculaires présomptives migrent depuis les somites et forment des masses musculaires dorsales et ventrales. Barre d'échelle = 0,1 mm.



conduit à la croissance du bourgeon. Au fur et à mesure de cette croissance, certaines cellules quittent cette région, se différencient et forment les éléments cartilagineux du membre. La partie proximale du membre se différencie en premier et, au fur et à mesure de la croissance du bourgeon, les parties de plus en plus distales du membre se différencient les unes après les autres, la différenciation de la région de la main se faisant en dernier. Des différentes structures du membre, c'est le cartilage, aisément colorable et visualisable en montage *in toto* de membre (Fig. 11.2), dont la mise en place a été la plus étudiée. La disposition des muscles et tendons est plus complexe et, quoique étudiable en montage *in toto* de membres marqués avec des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques de ces tissus, son étude nécessite généralement des études histologiques sur coupes sériées.

Le premier signe de la différenciation du cartilage est l'augmentation locale de densité de cellules mésenchymateuses, un phénomène appelé **condensation**. Les éléments cartilagineux se forment selon une séquence proximo-distale : ainsi dans l'aile du poulet, l'humérus se forme en premier, suivi du radius et de l'ulna (cubitus), puis les éléments squelettiques du poignet (carpe) et enfin ceux des trois doigts présents (doigts 2, 3 et 4 ; Fig. 11.2). La Figure 11.5 compare les séquences très similaires de formation des différentes parties de l'aile du poulet et de la patte antérieure de la souris. Cette figure montre également les changements de forme du membre au cours de son développement. Une échancrure, qui marque la région du coude, apparaît ainsi au niveau de la bordure antérieure du membre en croissance et plus tard la partie distale du bourgeon s'élargit et s'aplatit pour former la **palette de la main** à partir de laquelle se formeront notamment les doigts.

Le bourgeon de membre du poulet après trois jours d'incubation fait environ 1 mm de long sur 1 mm de large. Après dix jours d'incubation, sa taille s'est accrue d'un facteur dix, principalement en longueur. À ce stade, même si son organisation de base est déjà établie depuis un moment, le membre est beaucoup plus petit que celui du poussin au moment de l'éclosion. L'AER disparaît dès que les éléments de base du membre sont mis en place et la suite du développement consiste principalement en de la croissance qui se déroule tant avant qu'après l'éclosion. Pendant cette phase de croissance, la majeure partie du cartilage est remplacée par de l'os. Des nerfs pénètrent dans le membre après que le cartilage a été formé, soit environ après quatre jours d'incubation, et ceci sera discuté dans la Chapitre 12. Le changement fondamental de forme se déroulant dans le membre en formation est l'élongation du bourgeon et les mécanismes généraux de cette élongation semblent être les mêmes que ceux impliqués dans l'élongation d'autres parties de l'embryon, par exemple la région postérieure du corps. Une question fondamentale concernant le développement des membres est de comprendre comment l'organisation des cartilages, des muscles et des tendons se met correctement en place et comment ces différents tissus

se connectent les uns aux autres. Avant cela, seront examinés les mécanismes qui font que les bourgeons de membre se forment à des positions adéquates le long de l'axe antéro-postérieur.

11.2 La position et l'identité axiale des membres sont définies par l'activité de gènes exprimés dans le mésoderme des lames latérales

Les membres antérieurs et postérieurs des vertébrés se forment à des positions précises le long de l'axe antéro-postérieur du corps. Des expériences de transplantation chez le poulet ont montré que le mésoderme des lames latérales situé à ces positions est déterminé pour former des bourgeons membres bien avant que ceux-ci ne soient visibles. Comme dans le mésoderme présomitique (Chapitre 5), les gènes Hox sont exprimés de manière localisée le long de l'axe antéro-postérieur du mésoderme des lames latérales. Les gènes des groupes de paralogie 4 et 5 sont par exemple exprimés dans la partie des lames latérales qui formera les membres antérieurs, alors que ceux des groupes 8, 9 et 10 sont exprimés plus postérieurement. Un code combinatoire de gènes Hox définit la position à laquelle les membres se forment, en contrôlant





Fig. 11.4 Micrographie d'un bourgeon de membre d'un embryon à 4,5 jours d'incubation, observé au microscope électronique à balayage, montrant la crête apicale ectodermique (AER). Barre d'échelle = 0,1 mm.



Fig. 11.6 Représentation schématique de l'initiation du développement du bourgeon de membre chez le poulet et la souris. Un code combinatoire d'expression de gènes Hox dans le mésoderme des lames latérales détermine où les membres vont se développer, en activant l'expression de Tbx5 et de Tbx4 dans les régions où respectivement les membres antérieur et postérieur vont se former. Pitx1, qui est également exprimé dans la région des lames latérales où se forme le membre postérieur, est requis pour l'expression de Tbx4 et spécifie l'identité du membre comme membre postérieur. Tbx4 et Tbx5 activent l'expression de Fgf10 dans la région qui forme le membre et la signalisation FGF-10 induit l'expression de Fgf8 dans l'ectoderme sus-jacent qui va former la crête apicale ectodermique (AER). Une boucle de rétroaction positive se met en place dans les membres postérieurs et antérieurs, par laquelle les gènes Faf8 et Faf10 maintiennent mutuellement leurs expressions. Les flèches blanches dans le schéma de gauche représentent des signaux émis par les somites et le mésoderme paraaxial et qui pourraient être impliqués dans les toutes premières étapes du processus.

D'après Duboc, V., Logan, M.P. : **Regulation** of limb bud initiation and limb-type morphology. Dev. Dyn. 2011, 240 : 1017-1027. l'expression des gènes *Tbx4* et *Tbx5*, qui codent des facteurs de transcription de la famille des facteurs à boîte T, et qui sont nécessaires à l'initiation de la formation des membres antérieurs (*Tbx5*) et postérieurs (*Tbx4*).

Les gènes *Tbx5* et *Tbx4*, qui sont apparentés au marqueur mésodermique *Brachyury* (Section 4.12), sont en effet exprimés dans les régions qui forment les futurs membres antérieurs ou postérieurs, respectivement (Fig. 11.6). L'expression de *Tbx5* est restreinte à la région formant les membres antérieurs, suite à son activation par les protéines Hox des groupes 4 et 5 et sa répression par des protéines Hox plus "postérieures". Les cellules de la région qui forme le membre postérieur expriment les gènes *Tbx4* et *Pitx1*. Les mécanismes régulant l'expression de ces deux gènes sont encore mal connus. *Pitx1* code un facteur de transcription à homéodomaine et joue un rôle clé dans la distinction entre membres postérieurs et antérieurs, mais une possible régulation de son expression par des protéines Hox reste ignorée. Des mutations des gènes *TBX5* et *PITX1* ont été associées à des malformations des membres dans l'espèce humaine. Le syndrome de Holt-Oram, caractérisé par des malformations des membres antérieurs et du cœur, est ainsi dû à des mutations des membres postérieurs.

Tbx4 et *Tbx5* sont essentiels au développement des membres, respectivement postérieurs et antérieurs, et contrôlent la production locale de protéines FGF qui initient le développement des membres.

L'application locale de FGF sur le flanc d'un embryon précoce de poulet dans la région située entre les bourgeons de membres antérieurs et postérieurs, provoque la formation d'un bourgeon de membre ectopique, de type aile ou patte selon que FGF est appliqué à des régions plus ou moins antérieures ou postérieures (Fig. 11.7). Le gène *Fgf10* est exprimé dans les régions du mésoderme des lames latérales qui vont former les membres et son expression est sous le contrôle des protéines Tbx4 et Tbx5 (Fig. 11.6). Ce gène est requis pour la formation des membres : chez la souris où il est possible, contrairement au poulet, d'invalider spécifiquement la fonction d'un gène (souris *knock-out*), l'invalidation génétique du gène *Fgf10* ou du gène codant son récepteur conduit à la formation d'embryons dépourvus de bourgeons de membre. Chez les embryons de poulet, les protéines Wnt produites et sécrétées par le mésoderme jouent un rôle crucial dans la détermination des sites où sont produites et se maintiennent les protéines FGF.

La signalisation FGF est impliquée dans l'établissement et la maintenance des deux principales régions organisatrices du membre en développement. Il s'agit d'une part, de la crête apicale ectodermique (AER), déjà mentionnée (Section 11.1) et qui est nécessaire à la croissance du bourgeon de membre et pour avoir une organisation correcte du membre le long de son axe proximo-distal, et d'autre part, de la



Fig. 11.7 Résultat de l'application locale de FGF-4 dans la région qui sépare les deux membres d'un embryon de poulet. Une bille imprégnée de FGF-4 a été implantée dans le flanc près du bourgeon de membre et a provoqué le développement d'un bourgeon de patte additionnel. Les régions sombres correspondent aux endroits où on retrouve les ARNm de *Sonic hedgehog.* Ce gène est exprimé normalement dans la partie postérieure des bourgeons de patte et d'aile, mais ici, pour une raison inconnue, il l'est dans la région antérieure du bourgeon additionnel. La patte additionnelle qui se formera aura une polarité inversée par rapport aux pattes normales. Barre d'échelle = 1 mm.

Photographie reproduite avec l'autorisation de Cohn, M.J., et al. : **Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos**. Cell 1995, **80** : 739-746. © 1995 Cell Press.

zone à activité polarisante (ou ZPA pour *Zone of Polarizing Activity*), région mésodermique située dans la partie postérieure du bourgeon de membre et cruciale pour l'organisation du membre le long de son axe antéro-postérieur. L'AER se forme à la frontière entre les compartiments dorsaux et ventraux ectodermiques du tronc (voir Section 2.24 pour une explication sur la notion de compartiment), qui sont définis dans l'embryon précoce avant que les bourgeons de membre ne se forment. Les cellules qui vont former l'AER sont initialement dispersées dans l'ectoderme et ensuite migrent vers la frontière entre les compartiments. Les cellules du l'AER commencent à exprimer *Fgf8* en réponse à la signalisation FGF-10 émise par les cellules du mésenchyme et une boucle de rétroaction positive se met en place, par laquelle FGF-8 produit par les cellules de l'AER maintient l'expression de *Fgf10* dans le mésenchyme (Fig. 11.6). Le gène *Sonic hedgehog* (*Shh*), qui code une protéine de signalisation, est spécifiquement exprimé dans les cellules de la ZPA comme le montre sa détection par hybridation *in situ* (Fig. 11.7). Une fois ces centres de signalisation établis, les bourgeons peuvent se développer de façon autonome.

11.3 La crête apicale ectodermique est requise pour la croissance du membre et la formation des différentes structures le long de son axe proximal-distal

Comment le bourgeon de membre commence-t-il à croître et à se développer ? Une région émettrice de signaux essentielle du bourgeon est l'AER qui est composé de cellules épithéliales cylindriques connectées entre elles par des jonctions communicantes permettant le passage d'ions et de petites molécules entre les cellules. L'AER est essentiel à la croissance du bourgeon de membre et à la formation progressive des différents éléments squelettiques le long de l'axe proximo-distal. Si l'AER est chirurgicalement retiré d'un bourgeon de membre de poulet, la croissance de celui-ci est fortement diminuée et l'aile qui en dérive est tronquée (les parties distales de l'aile ne se forment pas). Le niveau proximo-distal de la troncature dépend du moment auquel l'AER a été enlevé, l'effet étant d'autant plus grand que l'ablation est précoce : si l'AER est retiré tôt dans le développement du membre, seule la partie la plus proximale du membre se formera, alors que si l'AER est retiré à un stade tardif, seule la partie distale des doigts sera manquante (Fig. 11.8). Suite au retrait de l'AER, la prolifération cellulaire à l'extrémité du bourgeon de membre est fortement réduite et de la mort cellulaire est observée dans cette région. À l'inverse, la greffe d'AER de manière ectopique sur la face dorsale d'un bourgeon de membre chez le poulet provoque une excroissance de cette surface dorsale qui développe alors des éléments cartilagineux et des doigts.

L'activité de signalisation de l'AER est due à des FGF. Le gène Fgf8 est exprimé dans toutes les cellules de l'AER et trois autres gènes de la famille, dont Fgf4, sont exprimés dans la partie postérieure de l'AER. Chez le poulet, si l'AER est retiré et si des billes imprégnées de FGF-8 ou de FGF-4 sont placées à l'extrémité du bourgeon de membre, une croissance quasiment normale de celui-ci est observée et, pour autant qu'il y ait suffisamment de FGF, une aile presque normale se forme (Fig. 11.9). FGF-8 et FGF-4 peuvent donc agir comme des substituts fonctionnels de l'AER. L'invalidation conditionnelle des gènes Fgf dans l'AER de la souris a montré l'importance de ces gènes pour la croissance et le développement du membre. Une troncature complète du membre n'est observée que si Fgf8 et au moins deux autres des gènes Fgf exprimés dans l'AER sont simultanément invalidés. Le gène Fgf8 peut donc seul assurer un





Fig. 11.8 La crête ectodermique apicale (AER) est requise pour le développement proximo-distal du membre. Les membres se développent selon une séquence proximodistale. L'ablation de l'AER d'un bourgeon d'aile en développement conduit à la troncature de l'aile. Plus l'ablation est faite tard, plus l'aile sera complète.



Fig. 11.9 Le facteur de croissance FGF-4 peut se substituer à la crête ectodermique apicale (AER). Après ablation de l'AER, l'implantation de billes d'héparine imprégnées de FGF-4 à l'extrémité du bourgeon alaire du poulet permet un développement quasiment normal. développement normal du membre. L'explication la plus simple de ces observations est que les différents gènes *Fgf* exprimés dans l'AER sont dans une large mesure fonctionnellement équivalents et que le fait d'avoir plusieurs gènes *Fgf* impliqués assurerait la robustesse de l'activité de signalisation de l'AER.

11.4 La croissance du bourgeon de membre fait appel à des comportements cellulaires orientés

Comment le bourgeon de membre se forme-t-il initialement et acquiert-il par la suite sa forme allongée ? Chez le poulet, pendant les 24 à 30 premières heures de son développement, le bourgeon de l'aile voit sa longueur le long de l'axe proximo-distal s'accroître d'un facteur 3, alors que ses dimensions le long des deux autres axes ne changent quasiment pas.

L'établissement du bourgeon précoce de l'aile chez les embryons de poulet n'implique pas une augmentation locale du taux de prolifération cellulaire dans la région qui va former le bourgeon, mais au contraire une diminution de ce taux dans cette région par rapport au reste de la région latérale de l'embryon. Des cellules sont également recrutées dans le bourgeon de membre *via* une transition épithélio-mésenchymateuse, spécifiquement dans les régions qui vont former les membres, de certaines cellules de l'épithélium cœlomique dérivant des lames latérales.

Des cellules prolifèrent dans tout le bourgeon de membre pendant son élongation et, quoique de nombreuses études aient montré que la prolifération est plus intense dans la partie distale de bourgeon près de l'ectoderme, des modélisations informatiques du bourgeon de membre de souris ont révélé que ces différences locales de prolifération ne sont pas suffisantes pour expliquer la croissance orientée du bourgeon. La polarisation des cellules, ainsi que des mouvements et divisions cellulaires orientés, jouent des rôles importants dans la formation et l'élongation des bourgeons de membre. L'observation d'embryons de souris vivants a montré l'apparition de changements radicaux dans l'orientation des cellules au moment où le bourgeon de membre se forme. Juste avant cette formation, les cellules de la région latérale du corps sont orientées parallèlement à l'axe antéro-postérieur du corps et leurs divisions se font selon un plan perpendiculaire à cet axe. Le déplacement des cellules, attesté par les positions relatives de leur appareil de Golgi et noyau, se fait vers le pôle postérieur (Fig. 11.10, à gauche). Au moment où le bourgeon se forme, les cellules latérales au bourgeon se réorientent perpendiculairement à l'axe du corps en s'alignant avec l'axe proximo-distal du bourgeon de membre. Les divisions et les mouvements cellulaires acquièrent la même orientation. Au même moment, des cellules se déplacent de positions antérieures dans la paroi du corps vers les régions distales et postérieures du bourgeon (Fig. 11.10, au milieu). Des divisions cellulaires successives et



ces mouvements cellulaires vers l'intérieur du bourgeon de membre provoque son élongation orientée.

Dans les bourgeons de membre en cours d'élongation, l'orientation des cellules devient plus complexe. Tant chez le poulet que chez la souris, les cellules centrales restent orientées le long de l'axe proximo-distal, mais les cellules en périphérie acquièrent une orientation presque perpendiculaire à l'ectoderme. Les cellules des deux zones montrent généralement des divisions et des mouvements orientés vers la partie distale du bourgeon, les cellules distales se déplaçant plus vite que les cellules proximales, ce qui permet la poursuite de l'élongation orientée du bourgeon (Fig. 11.10, à droite).

Le comportement orienté des cellules dans le bourgeon de membre précoce est régulé par l'activité combinée des voies de signalisation FGF et Wnt/PCP (PCP pour *Planar Cell Polarity* ; Encart 9C). Un gradient de Wnt5a, un des ligands Wnt capables d'agir *via* la voie Wnt/PCP, est observé dans le mésenchyme du bourgeon de membre, la concentration la plus élevée se retrouvant dans la partie distale du bourgeon. Des souris chez lesquelles le gène *Wnt5a* a été invalidé génétiquement, ont des membres courts et la partie distale des doigts est manquante. La taille du bourgeon de membre chez ces souris mutantes est réduite dans l'axe proximo-distal et augmentée dans l'axe dorso-ventral. L'observation du développement du bourgeon de membre de ces souris montre que les cellules mésenchymateuses ne sont pas allongées, et que les divisions et mouvements cellulaires ne sont que peu orientés. Ceci suggère que, dans le bourgeon de membre normal, les cellules mésenchymateuses subissent une extension convergente sous l'influence de Wnt-5a (Encart 9C), qui contribue à l'élongation du bourgeon de membre et à l'épaisseur dorso-ventrale de celui-ci.

D'autres expériences montrent que Wnt-5a pourrait agir comme un chimio-attractant dans le bourgeon de membre précoce et polariser la migration des cellules mésenchymateuses vers le bourgeon en formation. *Wnt5a* est exprimé à l'extrémité de toutes les régions de l'embryon qui subissent une croissance orientée, pas seulement les bourgeons des membres, mais aussi les bourgeons des mâchoires et des tubercules génitaux, ainsi que la région postérieure du corps. On peut donc penser que l'orientation et la polarisation des cellules contrôlées par Wnt-5a sont un mécanisme général de l'élongation.

La protéine FGF-4, produite par les cellules de l'AER, joue également un rôle de chimio-attractant pour les cellules mésenchymateuses du bourgeon de membre. FGF-8 contrôle quant à lui la vitesse de déplacement des cellules mésenchymateuses du bourgeon de membre, ce qui explique que dans les bourgeons de poulet et de souris, les cellules distales se déplacent plus rapidement que les cellules proximales. De manière intéressante, la voie de signalisation FGF contrôle également un gradient de motilité cellulaire dans le mésoderme présomitique en extension, lors de l'élongation de l'axe antéro-postérieur dans l'embryon de poulet. Dans ce cas, néanmoins, c'est la totalité du tissu qui se déforme et les cellules se déplacent en fait dans toutes les directions, la direction de l'élongation étant contrainte par la présence de tissus voisins plus denses.

Fig. 11.10 Orientations des cellules pendant la formation et la croissance du **bourgeon de membre.** À gauche : avant la formation du bourgeon, les cellules mésenchymateuses du mésoderme des lames latérales sont orientées parallèlement à l'axe antéro-postérieur du corps, sont pointées vers la région postérieure (voir la direction des flèches) et se déplacent dans cette direction. Les divisions cellulaires sont également orientées dans le même sens. Au centre : le bourgeon de membre précoce se forme, suite, d'une part, à ce que les cellules latérales du mésoderme des lames latérales s'orientent perpendiculairement à l'axe antéro-postérieur du corps et se déplacent vers l'extrémité du bourgeon, et, d'autre part, à ce que des cellules antérieures du mésoderme migrent postérieurement dans le bourgeon. À droite : dans le bourgeon en élongation, les cellules au centre et à l'extrémité du bourgeon sont orientées parallèlement à l'axe proximo-distal du bourgeon, se déplacent vers l'AER et leurs divisions sont orientées dans la même direction. Les cellules des parties dorsale et ventrale sont orientées vers l'ectoderme. Les deux schémas de gauche sont basés sur des observations chez la souris, celui de droite sur des observations chez le poulet.

Deux premiers schémas : d'après Wyngaarden, L.A. et al. : Oriented cell motility and division underlie early limb bud morphogenesis. Development 2010, 137 : 2551-2558; troisième schéma : Gros, J., et al. : Wnt5a/Jnk and FGF/Mapk pathways regulate the cellular events shaping the vertebrate limb. Curr. Biol. 2010, 20 : 1993-2002. Fig. 11.11 Les cellules acquièrent des valeurs positionnelles le long des axes antéro-postérieur et proximo-distal. Dans le bourgeon d'aile précoce du poulet, il y a deux principaux centres de signalisation, la zone à activité polarisante (ZPA, en rouge) dans la partie postérieure du bourgeon et la crête apicale ectodermique (AER, en bleu). La ZPA spécifie les positions le long de l'axe antéropostérieur. Comment les positions le long de l'axe proximo-distal sont-elles spécifiées, reste une question débattue (Section 11.6). Le cartilage se différencie d'abord dans la région la plus proximale et ensuite les éléments cartilagineux sont déposés selon une séquence proximo-distale (les éléments du carpe ne sont pas montrés).



11.5 La mise en place de l'organisation du bourgeon de membre fait appel à de l'information de position

Il a été vu comment l'AER contrôle la croissance du bourgeon de membre, mais comment les différents éléments du membre se forment-ils aux bonnes positions ? Certains aspects du développement du membre correspondent très bien à un modèle de mise en place de l'organisation d'une structure basée sur de l'information de position. Le bourgeon de membre chez le poulet se comporte comme si son développement était déterminé par la position de ses cellules par rapport aux axes principaux du membre, quand les cellules se trouvent dans la région distale indifférenciée du bourgeon (Fig. 11.11).

Un élément central du concept d'information de position est la distinction entre spécification et interprétation des valeurs de position. Les cellules acquièrent d'abord une information de position et ensuite interprètent cette information en fonction de leur histoire. Ce sont les différences d'histoire qui font que les ailes et les pattes de poulet sont dissemblables alors qu'un même système d'information de position agit dans les deux structures. Une hypothèse attractive est qu'un champ positionnel tridimensionnel unique contrôle le développement des cellules qui produisent tous les éléments squelettiques du membre, cartilages, muscles et tendons. La spécification des trois axes du membre est, comme il sera vu, liée à des signaux moléculaires émis par différentes parties du bourgeon de membre.

11.6 Comment la position le long de l'axe proximo-distal du bourgeon de membre est spécifiée reste une question ouverte

Les éléments squelettiques du membre se forment selon une séquence proximodistale, les éléments proximaux (humérus ou fémur) se différenciant les premiers. Des signaux Wnt émis par l'ectoderme et FGF produits par l'AER maintiennent une région de cellules mésenchymateuses indifférenciées à l'extrémité du bourgeon membre.

Suscitant encore certains débats, deux principales classes de modèle ont été proposées pour expliquer les mécanismes qui contrôlent la mise en place de l'axe proximo-distal. La première classe, qui dérive d'expériences anciennes faites sur le membre du poulet, propose que la spécification des positions le long de l'axe proximo-distal soit basée sur le temps que passent les cellules dans la zone des cellules indifférenciées. Cette région a pour cette raison été appelée la **zone de détermination progressive** (*progress zone*). La seconde classe dérive d'expériences plus récentes chez le poulet et la souris, et propose que des signaux diffusibles spécifient les informations de position proximo-distale dans le bourgeon de membre précoce, les éléments du membre se différenciant par la suite progressivement selon une séquence proximo-distale pendant la croissance du membre. Des données expérimentales supportent chacun des deux types de modèle, mais aucun modèle n'est entièrement consistant avec l'ensemble des données connues, et il reste encore beaucoup à apprendre concernant cet aspect de la formation du membre.

Au cours de la croissance du bourgeon de membre, des cellules sont continuellement en train de quitter la zone des cellules indifférenciées. Les premières cellules à la quitter produiront l'humérus ou le fémur, alors que les dernières cellules à quitter cette zone formeront l'extrémité des doigts. Le modèle basé sur le temps propose que, si les cellules étaient capables de mesurer le temps passé dans la zone des cellules indifférenciées, par exemple en comptant le nombre de divisions cellulaires, cela leur donnerait l'information de leur position le long de l'axe proximo-distal (Fig. 11.12, en haut). La troncature distale du membre provoquée par l'ablation de l'AER (Fig. 11.8) serait ainsi due au fait que la zone de détermination progressive n'est pas maintenue en l'absence d'AER. Un modèle similaire, basé sur le temps, a été proposé pour la mise en place des informations positionnelles dans le mésoderme para-axial au cours de la formation des somites (Section 5.8).

Parmi les arguments en faveur de ce modèle, il y a des expériences dans lesquelles des cellules de la zone de détermination progressive d'un bourgeon d'aile de poulet ont été tuées (par exemple par irradiation aux rayons X) à un stade précoce, ce qui conduit à une absence des structures proximales, alors que les structures distales se forment et sont presque normales. Suite à l'irradiation, de nombreuses cellules de la zone de détermination progressive ne se divisent pas et moins de cellules quittent la zone durant chaque unité de temps qu'habituellement. Le bourgeon continuant à croître, la zone de détermination progressive est repeuplée grâce à la prolifération des cellules survivantes qui vont rester plus longtemps que la normale dans la zone de détermination progressive, et donc acquérir une valeur de position plus distale et



Fig. 11.12 La valeur de position proximodistale d'une cellule pourrait dépendre du temps qu'elle passe dans la zone de détermination progressive ou pourrait être spécifiée par des signaux opposés dans le bourgeon de membre précoce. Les schémas du haut explicitent le modèle basé sur le temps. Des cellules sortent continuellement de la zone de détermination progressive. Si les cellules pouvaient mesurer le temps passé dans cette zone, cela pourrait spécifier leur position le long de l'axe proximo-distal. Les cellules qui guittent rapidement la zone (en rouge) forment les structures proximales, alors que celles qui la quittent en dernier forment le bout des doigts. Les schémas du bas illustrent le modèle à deux signaux. Les cellules dans le bourgeon précoce acquièrent des valeurs de position grâce à la présence de signaux opposés : l'un est dû à une source d'acide rétinoïque dans les régions proximales et spécifie une identité proximale (en rouge) : l'autre est dû aux FGF émis par l'AER et spécifie l'identité distale (en bleu). Quand le bourgeon croît, certaines cellules acquièrent une identité intermédiaire (en vert) car elles sont en dehors de la zone d'influence des deux signaux.

D'après Zeller R., et al. : Vertebrate limb bud development : moving towards integrative analysis of organogenesis. Nat. Rev. Genet. 2009, 10 : 845-858. former des structures distales normales. D'autres travaux suggèrent en revanche que les structures proximales sont plus affectées simplement parce que les quelques cellules ayant survécu à l'irradiation, bien que spécifiées comme cellules proximales, ne sont pas assez nombreuses pour former des éléments cartilagineux. Les deux mêmes types d'arguments ont été proposés pour expliquer l'absence de la partie proximale des membres chez des bébés (anomalie appelée **phocomélie**) nés, dans les années 1950-1960, de mères ayant pris un médicament, la thalidomide, pendant leur grossesse pour soulager leurs nausées matinales (Encart 11A).

Si le rôle clé des FGF, produits par l'AER, a été considéré dans le développement des membres, quel est leur rôle dans la mise en place de l'axe proximo-distal ? Selon le modèle basé sur le temps, la fonction de la signalisation FGF est de maintenir la zone de détermination progressive et les cellules pourraient mesurer le temps par la durée pendant laquelle elles sont exposées aux signaux FGF. Selon l'autre type de modèle, les protéines FGF qui diffusent depuis l'AER dans le mésenchyme sous-jacent spécifieraient directement les valeurs de position distales. Une version de ce dernier modèle, appelé modèle à deux signaux (Fig. 11.12, en bas), propose que le signal FGF distal s'oppose à un signal proximal d'acide rétinoïque diffusant depuis la paroi voisine du corps vers le bourgeon de membre et qui y spécifie les valeurs de position proximales.

Une telle interaction entre les signalisations FGF et de l'acide rétinoïque ne serait pas unique au membre en développement. Des gradients opposés de ces molécules semblent être également à l'œuvre pendant la croissance du corps le long de l'axe antéro-postérieur, la formation des somites et la différenciation de la moelle épinière (Sections 5.8 et 5.9). Les cibles de l'acide rétinoïque dans le membre en développement incluent les gènes *Meis* qui codent des facteurs de transcription à homéodomaine. Ces gènes sont exprimés dans la partie proximale du bourgeon et leur expression ectopique dans tout le bourgeon conduit à des anomalies distales ou à des troncatures. Des résultats récents obtenus chez le poulet suggèrent un rôle clé de l'acide rétinoïque dans la spécification des parties proximales de l'aile, même si cela est encore débattu. La façon dont les parties distales du membre sont spécifiées n'est pas très claire.

Des données génétiques obtenues chez la souris ont été interprétées selon le modèle à deux signaux. Quand la signalisation FGF est progressivement réduite en inactivant les gènes Fgf un par un dans l'AER, une série ordonnée de troncatures plus ou moins fortes est observée. Quand la signalisation FGF est fortement réduite, on obtient notamment des membres dans lesquels les parties proximales (humérus) et distales (doigts) sont présentes, mais qui sont dépourvus des éléments intermédiaires (radius et ulna). Ce phénotype est difficilement réconciliable avec le modèle basé sur le temps selon lequel l'axe proximo-distal est spécifié de manière séquentielle. Une explication serait que les éléments proximaux et distaux du membre seraient initialement spécifiés, respectivement par les signalisations de l'acide rétinoïque et FGF, et qu'ensuite la croissance du membre, contrôlée par les signaux FGF émis par l'AER, conduirait à l'émergence d'une région cellulaire en dehors du champ d'action des signaux proximaux et distaux. Cette région adopterait de ce fait une identité "intermédiaire" et formerait le radius et l'ulna (Fig. 11.12). Il n'est pas clair si ce mécanisme de formation des parties intermédiaires peut s'appliquer au membre du poulet. Lorsque l'extrémité d'un bourgeon d'aile tardif de poulet, qui forme des éléments distaux du membre, est greffée sur un bourgeon précoce d'aile, qui va former des éléments proximaux du membre, l'aile qui se développe suite à cette greffe est dépourvue des éléments intermédiaires, radius et ulna.

11.7 La zone à activité polarisante spécifie les positions le long de l'axe antéropostérieur du membre

La spécification des informations positionnelles le long de l'axe antéro-postérieur du bourgeon de membre est le plus clairement observable au niveau des doigts car elle leur donne leurs identités. Dans cette section et les deux suivantes, seront examinés comment se forment les trois doigts de l'aile du poulet, quelles sont les molécules de signalisation impliquées dans leur formation et comment chaque doigt acquiert son identité unique. Une région mésodermique située à la bordure postérieure du



Fig. 11.13 La zone à activité polarisante (ZPA) est localisée à la marge postérieure du bourgeon de membre du poulet. Les cellules de cette région expriment le gène *Sonic hedgehog (Shh)* (ARNm de ce gène en bleu). Barre d'échelle = 0,1 mm.

Photographie aimablement communiquée par C. Tabin.







Fig. 11.14 La zone à activité polarisante (ZPA) peut spécifier des informations positionnelles le long de l'axe antéro-postérieur. Si la ZPA est la source d'un gradient de concentration d'un morphogène, les différents doigts pourraient être spécifiés à différents seuils de concentration du signal, comme cela est montré pour une aile normale de poulet dans les illustrations du haut, dans laquelle le doigt 4 se forme là où la concentration est la plus élevée et le doigt 2 là où elle est faible. Les seuils de concentration du morphogène qui spécifient

les différents doigts sont représentés dans la colonne centrale, et les doigts formés révélés dans les photographies à droite avec des rappels de couleur. La greffe d'une zone à activité polarisante additionnelle dans la région antérieure du bourgeon d'aile (illustrations au centre) conduirait à une duplication en miroir du gradient de signal et donc à la duplication observée des doigts. La greffe d'un petit nombre de cellules de la ZPA dans la région antérieure du bourgeon ne produit qu'un faible signal et seul un doigt 2 additionnel se forme (illustrations du bas).

bourgeon de membre, la **zone à activité polarisante** ou ZPA (pour *Zone of Polarizing Activity*) ou **région de polarisation**, joue un rôle clé dans la spécification de l'axe antéro-postérieur du membre (Fig. 11.13).

La ZPA a une activité organisatrice aussi frappante que celle de l'organisateur de Spemann chez les amphibiens. Quand cette région est prélevée d'un bourgeon précoce d'aile de poulet et greffée dans la partie antérieure d'un autre bourgeon au même stade, une aile avec une duplication en miroir des doigts se forme (6 doigts se forment avec une disposition 4 3 2 2 3 4 ; Fig. 11.14). La distribution des muscles et des tendons dans l'aile est modifiée de manière similaire. En outre, la greffe de la ZPA dans

ENCART 11A Les effets des tératogènes sur le développement embryonnaire

Un tératogène est un agent extérieur, comme un produit chimique ou un agent infectieux, qui interfère avec le développement embryonnaire et provoque des malformations visibles à la naissance du bébé. Ces malformations congénitales peuvent également être dues à des mutations et dans certains cas il est difficile de distinguer entre ces deux causes possibles.

Un des tératogènes les plus connus est la thalidomide. Ce médicament a été largement prescrit à la fin des années 1950 et début des années 1960, d'abord en Allemagne et ensuite partout en Europe et dans d'autres pays pour traiter les nausées matinales au début de la grossesse. Il est estimé qu'au moins 10 000 bébés sont nés dans le monde avec de graves malformations à cause de la thalidomide et 40 % d'entre eux sont morts pendant l'année qui a suivi leur naissance. Les malformations les plus évidentes concernent les membres, mais aussi d'autres organes, comme le cœur, les yeux et les oreilles. Les membres sont soit complètement inexistants soit absents dans une région le long de l'axe proximo-distal. Ainsi on peut observer une phocomélie, c'est-à-dire des anomalies de formation de la partie proximale du membre, alors que les régions distales sont normales (Figure 1). La période pendant laquelle un tératogène peut interférer avec le développement d'organes spécifiques, est appelée période critique. Pour la thalidomide, elle correspond aux jours 20 à 36 du développement embryonnaire, quand des structures comme le membre et le cœur se forment dans l'embryon.

Comment un tératogène aussi puissant a-t-il pu obtenir l'autorisation de mise sur le marché ? Avant de pouvoir être utilisé, un médicament doit subir toute une série de tests de sécurité, mais le laboratoire qui a développé la thalidomide a reconnu ne pas avoir testé ses effets sur des animaux gestants. Depuis les années 1950, les tests de sécurité des médicaments sont devenus plus rigoureux, notamment à cause des effets catastrophiques de la thalidomide. Par ironie du sort, la thalidomide n'a que peu d'effets sur le développement des souris et des rats qui sont généralement utilisés pour tester les effets tératogènes potentiels des médicaments.





Quand il devint clair que la thalidomide était un tératogène, celle-ci fut retirée du marché et des recherches furent menées pour essayer de comprendre ses effets sur le développement. Aujourd'hui encore il n'y a pas d'explications consensuelles sur la façon avec laquelle la thalidomide interfère avec le développement des membres. Une théorie est que celle-ci bloque la croissance des bourgeons de membre *via* un effet sur le système nerveux embryonnaire. Bien qu'il soit connu que la thalidomide affecte les nerfs chez l'adulte, il n'y a pas de données expérimentales montrant que des altérations des nerfs puissent affecter le développement des membres. Une autre théorie est basée sur la capacité de la thalidomide à provoquer une mort cellulaire. Comme discuté dans la Section 11.6, la phocomélie peut être causée chez le poulet suite à une mort cellulaire intense

la région antérieure du bourgeon de membre peut aussi conduire à la spécification d'un autre cubitus (ulna) antérieurement, indiquant que la ZPA influence les valeurs de position antéro-postérieures depuis le coude jusqu'aux doigts.

Les doigts additionnels proviennent des cellules du bourgeon receveur de la greffe et pas des cellules du greffon, montrant que la greffe de la ZPA a modifié le devenir des cellules de la région antérieure du bourgeon receveur. En réponse à la greffe, le bourgeon de l'aile s'élargit, ce qui permet la formation des doigts additionnels. Cet élargissement est associé à un accroissement de la prolifération cellulaire et à une maintenance de l'AER dans la région antérieure du bourgeon.

La ZPA pourrait spécifier les positions le long de l'axe antéro-postérieur en produisant un morphogène qui forme un gradient de concentration postéro-antérieur (Encart 11B). La concentration locale du morphogène fournirait une valeur de position aux cellules par rapport à la ZPA localisée à la bordure postérieure du membre. Les cellules pourraient alors interpréter cette valeur de position en formant des structures spécifiques selon les seuils de concentration du morphogène. Le doigt 4 par exemple se formerait provoquée par une irradiation aux rayons X du bourgeon de membre. La phocomélie induite par la thalidomide dans l'espèce humaine pourrait avoir la même cause.

La thalidomide a également un effet anti-angiogénique, en bloquant la formation des vaisseaux sanguins, ce qui a conduit, avec prudence, à sa réintroduction et à celle de ses analogues comme médicaments anticancéreux, notamment pour traiter le myélome multiple. Un analogue de la thalidomide avec des propriétés anti-angiogéniques, provoque des anomalies du développement des ailes chez le poulet, similaires à ceux observés avec l'irradiation des bourgeons alaires par des rayons X. Ce produit chimique interfère spécifiquement avec la formation de petits capillaires sanguins dans le bourgeon alaire précoce et l'interruption de l'apport sanguin provoque de la mort cellulaire dans le mésenchyme du bourgeon. Récemment il a été montré que la thalidomide se lie à la protéine Cereblon qui fait partie du complexe protéique qui promeut l'ubiquitination des protéines, les rendant susceptibles d'être dégradées. La thalidomide réduit l'activité du complexe, mais il n'est pas clair comment cela pourrait affecter le développement des membres.

Il a été rapporté que des bébés dont les parents avaient été affectés par la thalidomide, pouvaient présenter des membres anormaux, suggérant que la thalidomide pourrait être non seulement un tératogène, mais aussi un mutagène qui provoque des modifications héréditaires de certains gènes. On pense maintenant que ce n'est pas le cas et que les anomalies sont dues à des mutations pré-existantes présentes chez ces patients. Ainsi, un des parents diagnostiqué comme ayant été affecté par la thalidomide, possédait en réalité une mutation du gène *SALL4*. Ce gène est exprimé dans le membre en développement et des mutations de ce gène sont retrouvées chez des patients atteints du syndrome de Okihiro caractérisé par la thalidomide. Des effets similaires sont également observés dans le syndrome de Holt-Oram provoqué par des mutations de *TBX5* (Section 11.2).

Des déficiences des membres sont retrouvées dans environ 5 naissances sur 10 000, mais seul un petit pourcentage d'entre elles peut être attribué de manière sûre à des tératogènes et plus de 50 % d'entre elles sont dues à des causes génétiques. Dans environ 25 % des cas, la cause est inconnue et il est probable que les anomalies résultent souvent de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Le génotype d'un patient détermine sa réaction aux médicaments utilisés pour traiter sa maladie (c'est la base de la médecine personnalisée), mais pourrait également déterminer sa sensibilité aux agents extérieurs pouvant agir comme des tératogènes. Cela expliquerait pourquoi des femmes enceintes exposées aux mêmes facteurs environnementaux n'auront pas toutes des bébés affectés.

Il est important de savoir comment la thalidomide affecte le développement de l'embryon car ce médicament a été également réintroduit pour traiter la lèpre. Même s'il n'est plus recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), car des médicaments plus sûrs existent, il est encore utilisé et un petit nombre de bébés affectés par le thalidomide naissent chaque année.

La thalidomide est sans doute l'exemple le plus connu des tératogènes chimiques. La liste de ces derniers démontrés en tant que tels est assez courte et inclut des anticonvulsifs (triméthadione et acide valproïque), des antagonistes de l'acide folique, des rétinoïdes (dérivés de la vitamine A), l'éthanol et les dioxines. Une question importante est de comprendre comment ces tératogènes sont métabolisés car les produits résultants peuvent être plus ou moins nuisibles que la molécule d'origine. Bien qu'il soit connu qu'un déficit ou un excès de vitamine A est tératogène chez les animaux, des bébés présentant des malformations sont nés aux États-Unis de mères ayant été traitées avec des médicaments contenant des rétinoïdes utilisés pour traiter des maladies sévères de la peau (Encart 5C). L'éthanol affecte aussi le développement embryonnaire, peut-être parce qu'il est métabolisé par la même voie produisant l'acide rétinoïque.

Des agents infectieux peuvent être tératogènes. L'exemple le plus connu dans l'espèce humaine est le virus de la rubéole. Si une femme est infectée par ce virus pendant les 16 premières semaines de grossesse, la période critique de cet agent, le développement des oreilles, des yeux, du cœur et du cerveau pourra être affecté. Comment le virus provoque tous ces effets n'est pas connu. La vaccination a très largement éliminé la rubéole dans les pays développés, mais l'OMS estime qu'environ 110.000 bébés naissent chaque année dans le monde avec des anomalies dues au virus de la rubéole. Enfin, il faut noter que l'exposition à des agents physiques comme les fortes doses de radiations ionisantes peut aussi provoquer des malformations congénitales.

pour une concentration élevée, le doigt 3 pour une concentration plus basse, et le doigt 2 pour une concentration encore plus basse (Fig. 11.14, en haut). Selon ce modèle, la greffe de la ZPA conduirait à une duplication en miroir du gradient du morphogène, ce qui conduirait à la duplication des doigts qui est observée (Fig. 11.14, au centre).

Si l'action de la ZPA sur l'identité des doigts est bien due au niveau du signal, c'està-dire à la quantité de morphogène émis, alors si cette quantité est réduite, la formation des doigts devrait être altérée de manière prédictible. La greffe d'un petit nombre de cellules de la ZPA dans le bourgeon d'aile conduit à la formation d'un seul doigt 2 additionnel (Fig. 11.14, en bas). Un même effet est observé si on laisse la ZPA greffée en place pendant un temps limité et qu'ensuite on la retire. Si le greffon est laissé en place pendant 15 heures, seul un doigt 2 additionnel se forme, alors que s'il est laissé pendant 24 heures, un doigt 3 additionnel se développe également.

ENCART 11B Information de position et gradients de morphogènes



La mise en place de l'organisation de l'embryon peut être spécifiée par de l'information positionnelle qui elle-même peut être définie par un gradient de certaines propriétés moléculaires. L'idée de base, reliée au problème du « drapeau français » (Section 1.15), est qu'un groupe de cellules spécialisées à la frontière de la région devant acquérir une organisation, sécrètent une molécule dont la concentration diminue avec la distance par rapport à la source, formant donc un gradient (Figure 1, en haut à gauche). Une cellule à n'importe quel point de ce gradient peut « lire » la concentration locale et répondre de manière appropriée selon sa position. Les molécules qui agissent de cette manière sont appelées morphogènes et sont considérées comme formant des « gradients d'informations positionnelles ». Ces gradients ont certaines propriétés importantes. Ils fournissent notamment une mesure de la taille du tissu en termes d'étendue et de pente du gradient et ouvrent la possibilité d'une « mise à l'échelle » du tissu, permettant de maintenir la même disposition des éléments du tissu même si la taille totale du tissu varie. Les morphogènes sont impliqués dans de nombreux aspects du développement, telles la régionalisation le long des axes de l'embryon et la mise en place des segments et des disques imaginaux chez les insectes, ainsi que la mise en place de l'organisation du mésoderme, des membres et du tube neural chez les vertébrés.

Deux modes principaux de transport des morphogènes ont été envisagés, une diffusion extracellulaire ou un mouvement le long d'extensions cellulaires. Un morphogène pourrait en effet se déplacer par diffusion simple au travers des espaces extracellulaires et être dégradé ou piégé de manière permanente par les cellules qui lui répondent, de telle manière qu'un gradient se forme (« diffusion simple » Figure 1, en haut au centre). Il est peu probable, néanmoins, que la diffusion puisse se faire dans les tissus à cause des obstacles que représentent les cellules, et de la fixation des molécules morphogènes à leurs récepteurs et à des composés de la matrice extracellulaire. L'interaction entre le morphogène diffusant et d'autres protéines extracellulaires (« diffusion entravée », Figure 1, en haut à droite) peut même générer un gradient d'activité à partir d'une distribution initiale presque uniforme du morphogène. Un régulateur peut aussi se fixer sur le morphogène et servir de « navette » pour le transporter activement et ainsi former un gradient (« diffusion facilitée »; Figure 1, au centre ; voir un exemple Fig. 4.25).

Malgré des années de travail, il y a encore beaucoup de discussions quant à savoir si la diffusion des morphogènes sécrétés constitue un mécanisme efficace pour la mise en place d'un plan d'organisation. Un des modes alternatifs de transport est celui de cellules à cellules *via* de longs filopodes spécialisés chez les vertébrés ou des extensions similaires riches en actine appelés cytonèmes chez les insectes (Figure 1, en bas).





Figure 1

Adapté de Müller, P., et al. : **Morphogen transport.** Development 2013, **140** : 1621-1638. La protéine Decapentaplegic (Dpp) chez la drosophile est un bon exemple de morphogène. Elle intervient dans la formation de l'axe dorso-ventral de l'embryon précoce (Section 2.17) et plus tard lors de la mise en place de l'organisation antéro-postérieure de l'aile (Section 11.20). Au cours du développement précoce, le gradient de Dpp est mis en place grâce à l'interaction de Dpp avec d'autres protéines, des protéines extracellulaires sécrétées et des récepteurs membranaires. Dans l'aile, même si le gradient de Dpp a pu être visualisé grâce une protéine de fusion Dpp-GFP, la question de savoir si le gradient se forme par simple diffusion ou par des mécanismes plus complexes reste ouverte. Il y a, par exemple, des données expérimentales qui montrent que l'interaction de Dpp avec des molécules extracellulaires altère sa distribution.

Dans le disque imaginal d'aile, il a également été observé des cytonèmes s'étendant des cellules répondant à Dpp vers celles la produisant. Il a été montré que la protéine Dpp se déplace le long des cytonèmes vers les cellules lui répondant et il y a même des indications que l'étendue de l'action des protéines Dpp est liée au nombre et à la longueur des cytonèmes. Des données similaires ont été obtenues pour la protéine Hedgehog (Hh) dans le disque imaginal d'aile. Des filopodes sont aussi observés dans le membre en formation chez le poulet, et permettent le transport de Shh. Il n'est néanmoins pas clair si ce transport de Shh contribue à la formation du gradient de Shh dans le membre.

Il est probable qu'une cellule mesure la concentration d'un morphogène particulier par le nombre de ses récepteurs qui sont occupés et donc par l'intensité du signal transmis par ces derniers. Dans l'aile de drosophile, Dpp se fixe à son récepteur Thick Vein, ce qui conduit à la phosphorylation d'une protéine Smad appelée Mad. Un anticorps spécifique dirigé contre cette protéine phosphorylée (P-Mad) montre un gradient de distribution de P-Mad qui est linéairement corrélé à celui de Dpp.

La présence de la ZPA a été mise en évidence dans le bourgeon membre d'un grand nombre de vertébrés, notamment chez la souris, le cochon, le furet, la tortue et même l'espèce humaine. Quand la région postérieure d'un bourgeon de membre provenant de l'une de ces espèces, est greffée dans la partie antérieure d'un bourgeon d'aile de poulet, des doigts additionnels se forment. Ces doigts sont bien sûr des doigts d'aile de poulet, montrant que, si le signal émis par la ZPA est conservé chez les vertébrés, l'interprétation du signal dépend de la nature des cellules qui y répondent. Ceci est similaire à ce qui est observé lors de greffes inter-spécifiques de nœuds de Hensen chez différents embryons de vertébrés (Section 5.6).

11.8 Sonic hedgehog est le morphogène produit par la zone à activité polarisante

La protéine sécrétée Sonic Hedgehog (Shh) est le morphogène qui contrôle la mise en place de l'axe antéro-postérieur du membre chez les vertébrés. *Shh* est exprimé dans la ZPA des bourgeons de membre chez le poulet (Fig. 11.13), la souris et d'autres vertébrés, comme le poisson-zèbre, chez lesquels la formation des membres a été étudiée. Shh intervient à de multiples reprises dans le développement chez les vertébrés, par exemple lors de la formation des somites (Section 5.13), dans la mise en place de l'asymétrie droite-gauche chez le poulet (Section 5.17) et dans celle de l'organisation du tube neural (Chapitre 12). Son homologue chez la drosophile, Hedgehog (Hh), intervient dans la formation des segments de l'embryon (Section 2.26) et dans celle des ailes et des pattes comme cela sera vu ultérieurement dans ce chapitre.

Shh a toutes les propriétés attendues pour être le morphogène produit par la ZPA. Cette protéine est présente sous forme d'un gradient de concentration dans la région postérieure du bourgeon de membre à une certaine distance des cellules de la ZPA qui la produisent. Des fibroblastes de poulet en culture transfectés avec un rétrovirus contenant le gène *Shh* acquièrent les propriétés des cellules de la ZPA : greffés dans la partie antérieure d'un bourgeon d'aile de poulet, elles provoquent la duplication en miroir des doigts caractéristique d'une greffe de la ZPA. Le même effet peut être obtenu en implantant des billes imbibées de protéines Shh. Ces billes doivent rester en place de 16 à 24 heures pour que des doigts surnuméraires se forment et le nombre et la nature des doigts formés, dépendent de la concentration de Shh. Shh influence aussi la prolifération des cellules mésenchymateuses, en contrôlant l'expression de gènes codant des régulateurs du cycle cellulaire, ce qui peut expliquer l'élargissement du bourgeon de l'aile observé lors d'une greffe de la ZPA.

L'acide rétinoïque (Encart 5C) a été la première molécule caractérisée comme pouvant mimer l'activité organisatrice de la ZPA chez le poulet. L'application de cette molécule dans la partie antérieure du bourgeon de membre conduit en effet à des duplications en miroir des doigts. Cet effet est néanmoins indirect car il a été montré que celui-ci résultait de l'activation par l'acide rétinoïque, de l'expression de *Shh* dans les tissus antérieurs. La possibilité que la voie de signalisation de l'acide rétinoïque pourrait spécifier la partie proximale du membre, a déjà été évoquée, mais on ne sait pas si cette fonction est liée à sa capacité d'activer l'expression de *Shh*.

Un rôle crucial de Shh dans la formation des doigts a été mis en évidence chez les mammifères grâce à l'étude de mutations chez la souris qui provoquent des **polydactylies préaxiales**, c'est-à-dire la formation de membres avec des doigts surnuméraires dans leur partie antérieure. Ces mutations conduisent à une expression de *Shh* dans les parties antérieures et postérieures du bourgeon de membre. Des polydactylies préaxiales dues à des mutations sont également retrouvées dans l'espèce humaine (Encart 11C). À l'inverse, l'inactivation totale du gène *Shh* chez la souris conduit à la formation de membres dépourvus de doigts (membres antérieurs) ou n'en possédant qu'un seul (membres postérieurs).

Le gradient de concentration de Shh permet d'expliquer comment sont spécifiées les informations positionnelles des trois doigts de l'aile de poulet. Chez la souris dont les membres contiennent cinq doigts, la situation est plus compliquée, d'autant plus que les deux doigts les plus postérieurs se forment à partir de la ZPA ellemême. Il a donc été proposé que la concentration de Shh devait spécifier l'identité des trois doigts antérieurs, mais que la spécification des deux autres doigts devait dépendre de la durée de la signalisation Shh. Néanmoins la manière selon laquelle se forme précisément le gradient de Shh dans le bourgeon de membre n'a pas encore été clarifiée.

Comment les cellules du bourgeon de membre peuvent-elles mesurer la concentration de Shh ou la durée de signalisation Shh ? La réponse des cellules à Shh implique les facteurs de transcription Gli1, Gli2 et Gli3, qui sont les homologues de la protéine Ci chez la drosophile (Encart 2F). La voie de signalisation de Shh chez les vertébrés est détaillée dans l'Encart 11D. En présence de Shh, les protéines Gli agissent comme des activateurs transcriptionnels, alors qu'en son absence, les protéines Gli2 et Gli3 sont clivées et les formes courtes de ces protéines fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels. Le rapport entre Gli3 activateur et Gli3 répresseur dans une cellule reflète donc le niveau de signalisation Shh. Chez des souris déficientes pour le gène Shh, des niveaux élevés de Gli3 répresseur sont retrouvés partout dans le bourgeon de membre. Si le gène *Gli3* est inactivé chez la souris, de nombreux doigts, tous du même type, se forment. La fonction de la signalisation Shh est donc de supprimer selon une gradation, au cours du temps, la fonction de Gli3 répresseur dans les cellules de la région postérieure du bourgeon qui vont former les doigts. Les différences dans les rapports Gli3 activateur/Gli3 répresseur le long de l'axe antéro-postérieur détermine l'identité des doigts et leurs positions.

Certaines lignées mutantes de souris montrant une polydactylie et une réduction du taux de Gli répresseur, ne présentent pas de mutations du gène *Shh* ou de gènes codant des éléments de sa voie de signalisation. Des mutations se retrouvent en revanche au niveau de gènes essentiels à la formation d'une structure cellulaire appelée **cil primaire**. Ce cil non mobile est essentiel à la signalisation Shh et son rôle est décrit dans l'Encart 11D.

11.9 La manière dont l'identité des doigts est codée n'est pas connue

Une question majeure encore sans réponse est de comprendre comment l'information de position antéro-postérieure est codée et ensuite interprétée de telle manière que le type de doigts approprié se forme. Plusieurs gènes, tels *Sal1*, *Tbx2* et *Tbx3*, codant des facteurs de transcription, ainsi que les gènes *Hoxd13* et *Hoxd11*, sont des cibles de Gli3 dans le membre en développement et pourraient contribuer au codage de l'identité des doigts. Ces cibles ont été identifiées en combinant deux types de données expérimentales. D'une part, un répresseur Gli3 étiqueté grâce à une étiquette Flag (pouvant être détectée grâce à des anticorps spécifiques) a été produit dans le

ENCART 11C Des mutations qui affectent la formation de l'axe antéro-postérieur du membre peuvent causer des polydactylies

Des mutations qui affectent la fonction de la ZPA et provoquent des polydactylies préaxiales, c'est-à-dire la formation de membres avec des doigts surnuméraires dans leur partie antérieure, ont été identifiées chez la souris. Les polydactylies associées à ces mutations, par exemple chez le mutant *Sasquatch*,

sont dues à une expression ectopique de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon de membre. La mutation *Sasquatch* se localise dans un élément *cis*-régulateur du gène *Shh*, appelé ZRS (pour *Zone of polarizing activity Regulatory Sequence*), situé à 1 Mb de la région transcrite du gène et contrôlant l'expression de *Shh* dans le bourgeon de membre. Un autre exemple d'élément *cis*-régulateur agissant à longue distance, est retrouvé dans le gène β -globin et contrôle son expression dans les globules rouges au cours du développement (Section 8.9).

Des mutations ou des microduplications de la ZRS du gène *SHH* ont été retrouvées chez des patients humains présentant des polydactylies, confirmant l'importance de la signalisation Shh dans le développement du membre dans l'espèce humaine. Des mutations de la ZRS sont également observées chez des chats polydactyles avec des doigts surnuméraires antérieurs. Le célèbre écrivain Ernest Hemingway hébergeait une grande famille de chats polydactyles dans sa maison à Key West en Floride



Figure 1

La photographie provient de Lettice, L. A., et al. : **Point mutations in a distant Shh cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly**. Hum. Mol. Genet. 2008, **17** : 978-985.

polydactyles possédaient la même substitution d'un seul nucléotide au niveau de la ZRS. Des mutations de la ZRS ont également été retrouvées chez de nombreux autres animaux polydactyles, notamment dans la race de poules appelée « poule-soie » caractérisée par la présence d'un orteil surnuméraire à ses pattes.

> Les embryons de souris chez lesquels le gène Shh a été inactivé dans le membre, présentent des pattes dont la partie distale est manquante. Au mieux, un seul doigt de petite taille se forme au niveau des membres postérieurs. Ces souris présentent d'autres anomalies, notamment cranio-faciales comme l'holoprosencéphalie (Encart 1F) et au niveau de l'organisation de leur tube neural. Une délétion complète de la ZRS conduit à une absence d'expression de Shh dans la ZPA et provoque des troncatures du membre similaires à celles observées chez les embryons déficients pour le gène Shh. Les embryons présentant une délétion de la ZRS ne révèlent pas de défauts dans d'autres structures que le membre car seule l'expression de Shh dans le bourgeon de membre est affectée chez ces souris.

> L'absence de structures distales du membre est également observée chez des patients montrant une **achéiropodie**, un syndrome très rare caractérisé par l'absence des structures plus distales que le coude et le genou, et par aucune autre anomalie. Ce syndrome est

(Figure 1 ; voir aussi un de ces chats dans le film *L'homme au pistolet d'or*). Cette famille descendait d'un chat polydactyle offert à Hemingway par un capitaine de bateau et tous les individus provoqué par une délétion chromosomique d'une région proche de la ZRS, suggérant la présence dans cette région d'un élément *cis*-régulateur nécessaire à l'expression de Shh dans la ZPA.

bourgeon de membre de souris transgéniques et les endroits du génome où se fixent les protéines étiquetées ont été identifiés par immunoprécipitation de la chromatine (Section 3.12). D'autre part, des analyses par puces à ADN ont permis d'identifier les gènes différentiellement exprimés dans les régions antérieures et postérieures de bourgeon de membre de souris normales ou chez lesquelles *Shh* est inactivé. Ces données ont permis d'établir une ébauche du réseau de régulation génétique contrôlant la formation des doigts (pour d'autres exemples de réseaux de régulation génétique, Section 6.13).

Les gènes *Tbx2* et *Tbx3* sont exprimés d'abord dans le bourgeon de membre précoce et plus tard dans la palette de la main où se forment les doigts. Des condensations de cellules mésenchymateuses se produisent à des positions spécifiques de cette région et se développeront en doigts. Le tissu situé entre chacune de ces condensations est appelé **région interdigitale**. Dans la patte de poulet, *Tbx2* et *Tbx3* sont exprimés de manière chevauchante dans les régions interdigitales associées aux condensations correspondant aux deux doigts postérieurs. L'expression ectopique de *Tbx2* ou *Tbx3* conduit à la transformation d'un type de doigts en un autre. Il est donc vraisemblable que l'activité combinée de ces facteurs de transcription, ainsi que d'autres, code l'information de position antéro-postérieure. L'acquisition de l'identité des doigts dépend aussi d'interactions entre cellules des doigts en formation et des régions interdigitales. Un autre constituant du réseau de régulation génétique, *Bmp2*, qui code une proté-ine de signalisation sécrétée, est ainsi exprimé dans la partie postérieure du bourgeon de membre précoce et plus tard, avec d'autres gènes de la même famille, dans les **régions interdigitales**. Chaque doigt en formation est caractérisé par un niveau spécifique d'activité des facteurs de transcription Smad qui interprètent les niveaux de signalisation BMP (Encart 4C). L'excision du tissu interdigital ou l'implantation dans ce tissu de billes imprégnées d'un antagoniste des protéines BMP, Noggin (Section 4.13), provoque une antériorisation du doigt adjacent. La voie BMP semble donc impliquée dans les phases tardives de la morphogenèse de doigts, pendant lesquelles l'identité des doigts est acquise.

Les facteurs de transcription mentionnés ci-avant sont associés à certains **syndromes** humains qui incluent des malformations des membres. Des mutations de *TBX3* sont associées au syndrome de Schinzel (ou cubito-mammaire) et celles des gènes *SALL1* et *SALL4* respectivement aux syndromes de Townes-Brockes et de Okihiro-Duane (syndrome acro-réno-oculaire). Des mutations du gène *HOXD13* conduisent à de la polydactylie et à la fusion de certains doigts. Ces différents syndromes, ainsi que celui de Holt-Oram lié à des mutations de *TBX5* (Section 11.2) peuvent être confondus avec les effets de la thalidomide (Encart 11A).

11.10 La mise en place de l'axe dorso-ventral du membre est contrôlée par l'ectoderme

L'aile du poulet a une organisation bien définie le long de l'axe dorso-ventral : les grandes plumes sont présentes uniquement sur sa face dorsale et les muscles et les tendons montrent une organisation dorso-ventrale complexe. Les muscles fléchisseurs se développent sur la face ventrale et les extenseurs du côté dorsal.

La mise en place de l'organisation dorso-ventrale du mésoderme a été étudiée en recombinant de l'ectoderme d'un bourgeon de membre gauche avec le mésoderme d'un bourgeon de membre droit, de telle manière que l'axe dorso-ventral de l'ectoderme soit inversé par rapport à celui du mésoderme sous-jacent, les axes anté-ro-postérieurs restant inchangés. Pour ce faire, les bourgeons d'aile droits et gauches d'un embryon sont retirés et traités à la trypsine froide, ce qui permet de décoller et d'enlever l'ectoderme du mésoderme sous-jacent comme on le ferait avec un gant. L'ectoderme du bourgeon gauche est ensuite recombiné avec le mésoderme du bourgeon droit, de manière à ce que l'axe dorso-ventral de l'ectoderme soit opposé à celui du mésoderme, un peu comme si on mettait, en le retournant, un gant gauche sur une main droite (Fig. 11.15). Le bourgeon recombiné est ensuite greffé sur le flanc d'un embryon receveur De manière générale, le membre qui se forme à partir de



Fig. 11.15 Inversion de l'axe dorso-ventral de l'ectoderme du bourgeon de membre. La seule façon qu'un gant de main gauche (représentant l'ectoderme d'un bourgeon de membre à gauche) puisse s'ajuster sur une main droite (mésoderme du bourgeon droit) est de le retourner de telle manière que sa

est de le retourner de telle manière que sa face ventrale soit tournée vers le haut. Les faces ventrales et dorsales du gant sont alors inversées par rapport à l'axe dorso-ventral de la main, la relation antéro-postérieure restant la même. ces bourgeons « recombinés » a une partie proximale dont la polarité dorso-ventrale correspond à celle du mésoderme et une partie distale dont la polarité dorso-ventrale correspond à celle de l'ectoderme, c'est-à-dire inversée par rapport à celle de la partie proximale, ce qui est attesté par la disposition des tendons et des muscles. L'ectoderme du bourgeon peut donc spécifier l'organisation dorso-ventrale du bourgeon de membre.

Les gènes qui contrôlent l'axe dorso-ventral du membre des vertébrés, ont été identifiés chez la souris grâce à des mutations qui perturbent l'organisation dorso-ventrale caractéristique de la patte de la souris : la face ventrale de la patte n'a pas de poils contrairement à la surface dorsale qui présente en plus des griffes au niveau des doigts. Des mutations qui inactivent le gène Wnt7a conduisent à la formation de membres dont de nombreux tissus dorsaux sont transformés en tissus ventraux, donc constitués de deux parties ventrales, analogues à des images en miroir. Le gène Wnt7a est exprimé dans l'ectoderme dorsal (Fig. 11.16), suggérant que l'identité ventrale pourrait être l'identité par défaut du mésoderme et qu'elle est modifiée en dorsale grâce à la diffusion de Wnt-7a produite par l'ectoderme dorsal. Le gène Engrailed1 (En1), qui code un facteur de transcription à homéodomaine décrit en premier chez la drosophile (Section 2.24), est exprimé dans l'ectoderme ventral. Des mutations qui inactivent ce gène conduisent à une expression de Wnt7a dans l'ectoderme ventral, qui se traduit par la formation d'un membre à deux parties dorsales. L'expression de En1 dans l'ectoderme ventral est induite par la signalisation BMP.

Une des fonctions de Wnt-7a est d'induire l'expression dans le mésenchyme situé sous l'ectoderme dorsal, de Lmx1b qui code un facteur de transcription à homéodomaine de type LIM, (Fig. 11.16). L'analyse clonale de cellules marquées a montré l'existence de compartiments dorsaux et ventraux dans le mésenchyme du bourgeon de membre de la souris, la descendance des cellules dorsales du bourgeon se retrouvant uniquement dans la partie dorsale du membre et celle des cellules ventrales uniquement dans la partie ventrale. C'est le seul cas connu d'une compartimentation d'un tissu mésenchymateux ; tous les autres cas concernent des tissus épithéliaux, comme l'épiderme chez la drosophile (Chapitre 2) et les rhombomères du cerveau postérieur chez les vertébrés (Chapitre 12). Cette compartimentation pourrait servir à contrôler l'expression de certains gènes : Lmx1b, par exemple, est exprimé uniquement dans le compartiment dorsal. Chez le poulet, il a été montré que *Lmx1b* spécifie l'identité dorsale du mésoderme. Son expression ectopique dans le mésoderme ventral conduit les cellules à adopter une identité dorsale. Des mutations de perte de fonction de LMX1B dans l'espèce humaine provoquent le syndrome génétique nail-patella (syndrome de Turner-Kieser) caractérisé par l'absence ou des malformations des structures dorsales (ongles et rotules).

11.11 Le développement du membre nécessite des interactions entre les centres de signalisation

Il est nécessaire pour avoir une morphologie correcte du membre que la formation de ses trois axes se fasse de manière intégrée. Ceci va se faire grâce à des interactions entre les signaux Wnt-7a de l'ectoderme dorsal, FGF de l'AER et Shh de la ZPA. Chez des souris chez lesquelles *Wnt7a* est non fonctionnel, les doigts postérieurs sont souvent absents et l'expression de *Shh* est réduite dans la ZPA, ce qui suggère que *Wnt7a* est aussi requis pour la mise en place de la polarité antéro-postérieure du membre. Une réduction similaire de l'expression de *Shh* est retiré chez des embryons de poulet.

Une boucle de rétroaction positive entre la ZPA et l'AER a été découverte et relie le développement des axes proximo-distal et antéro-postérieur. La signalisation Shh maintient le niveau d'expression des gènes *Fgf* dans l'AER (Fig. 11.17) et la signalisation FGF maintient l'expression de *Shh* dans la ZPA. Cette boucle de rétroaction implique la protéine de signalisation BMP-4. Un niveau minimum de signalisation BMP est requis pour maintenir la croissance du bourgeon de membre, mais si ce niveau est trop important, l'AER régresse.



Fig. 11.16 L'ectoderme contrôle l'organisation dorso-ventrale du bourgeon de membre. Le gène qui code la molécule sécrétée Wnt-7a est exprimé dans l'ectoderme dorsal et le gène *Engrailed 1* est exprimé dans l'ectoderme ventral. L'expression de *Lmx1b*, qui code un facteur de transcription, est induite dans le compartiment dorsal du mésoderme par Wnt-7a et Lmx1b est impliqué dans la spécification des structures dorsales.



Fig. 11.17 Intégration des signaux contrôlant le développement du membre par des rétroactions. Gremlin est un antagoniste de BMP qui maintient l'activité de BMP à un niveau faible dans le mésoderme du bourgeon de membre, ce qui permet l'établissement d'une boucle de rétroaction positive. Les signaux FGF produits par l'AER maintiennent l'expression de Shh dans la ZPA, et en retour, le signal Shh issu de la ZPA maintient l'expression de Fqf dans l'AER. Les flèches indiquent des contrôles positifs par lesquels une molécule de signalisation promeut l'expression du gène et les lignes barrées indiquent soit un contrôle négatif de la signalisation par un antagoniste soit l'inhibition de l'expression génique. En bleu la boucle d'initiation avec un rétrocontrôle négatif ; en vert la boucle de propagation avec un rétrocontrôle positif.

D'après Bénazet J., Zeller R. : Vertebrate limb development : moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009, 1 : a001339.



ENCART 11D La signalisation Sonic hedgehog et le cil primaire

Figure 1

La protéine de signalisation Shh est un homologue chez les vertébrés de la protéine Hedgehog qui joue un rôle majeur dans le développement de l'embryon de drosophile (Chapitre 2). Trois gènes homologues de *hedgehog* sont retrouvés chez la souris et dans l'espèce humaine, *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) et *Desert hedgehog* (*Dhh*). Le poisson-zèbre possède un homologue supplémentaire, *Tiggywinkle*, dû à une duplication de son génome. La voie de signalisation stimulée par ces

Le niveau de signalisation BMP dans le bourgeon de membre précoce est contrôlé par un antagoniste des protéines BMP, Gremlin. L'expression de *Gremlin* est initialement induite dans le mésoderme du bourgeon par la signalisation BMP-4 et une boucle de rétroaction négative se met rapidement en place, Gremlin maintenant la signalisation BMP à un niveau faible. L'expression des gènes *Fgf* est de ce fait maintenue dans l'AER lors des stades les plus précoces du développement des bourgeons de membre, ce qui permet aussi le maintien de l'expression de *Shh*. La signalisation Shh maintient par la suite l'expression de *Gremlin*, et donc d'une faible activité de BMP dans le mésoderme du bourgeon de membre, renforçant la boucle de régulation positive entre les signalisations FGF et Shh (Fig. 11.17). Cette boucle de rétroaction positive nécessite 12 heures pour être pleinement fonctionnelle et est reliée à la boucle de rétroaction négative BMP-4/Gremlin qui elle se met en place très rapidement. Ceci constitue un excellent exemple de mécanismes de contrôle par des rétroactions, qui font que le développement est robuste et reproductible (Section 1.19). protéines chez les vertébrés (Figure 1) montre de nombreuses similitudes avec celle de la voie Hedeghog chez la drosophile (Encart 2F). On retrouve chez les vertébrés des homologues des protéines membranaires Patched et Smoothened, qui détectent la présence ou l'absence de signal, ainsi que des homologues du facteur de transcription Cubitus interruptus (Ci), les protéines Gli1, Gli2 et Gli3. Le nom Gli vient de l'identification initiale d'un de ces gènes comme un gène amplifié et fortement exprimé dans un gliome humain. Comme Ci, Gli2 et Gli3 peuvent être clivés et de ce fait agissent comme activateurs transcriptionnels quand le signal Hedgehog est présent et comme répresseurs quand il est absent. Des homologues de Cos2 et Su(fu) de drosophile (Encart 2F) forment des complexes avec les protéines Gli chez les vertébrés, maintenant ces protéines dans un état inactif.

Chez les vertébrés, le clivage des protéines Gli se déroule dans une structure cellulaire appelée cil primaire, ce qui n'est pas le cas chez la drosophile. La plupart des cellules chez les vertébrés possèdent cette structure qui, comme tous les cils, est composée de microtubules et s'étend à partir d'un corps basal dérivé d'un centrosome. Contrairement à la plupart des autres cils, le cil primaire n'est pas motile.

En l'absence de ligand comme Shh, Patched réprime l'activité de Smoothened, se déplace dans la membrane du cil et empêche Smoothened d'aller dans la membrane du cil. Les protéines Gli3 et Gli2 sont phosphorylées, ce qui les conduit à être clivées par le protéasome à la base du cil. Des formes courtes de ces protéines, issues de ce clivage, entrent dans le noyau et empêchent la transcription des gènes cibles de Shh. Quand Shh est présent, il se lie à Patched et active Smoothened. Le complexe Hedgehog-Patched est internalisé dans des vésicules membranaires et ne joue plus aucun rôle dans la signalisation. Des vésicules membranaires contenant la forme activée de Smoothened sont dirigées vers la membrane du cil, fusionne avec elle et délivre Smoothened dans la membrane de celui-ci. À l'extrémité du cil, Smoothened empêche la phosphorylation et donc le clivage de Gli3 et Gli2. Les formes complètes activatrices des protéines Gli sont ensuite transportées le long de microtubules du cil vers le corps

cellulaire, où elles entrent dans le noyau et activent la transcription de gènes cibles.

Les premiers indices de l'importance du cil primaire dans la signalisation Shh sont venus d'un crible génétique mené chez la souris visant à identifier des mutations affectant le développement embryonnaire, après mutagenèse à l'éthyl-nitroso-urée (Section 3.9). Deux mutations provoquant des défauts dans la signalisation Shh dans le tube neural ont été identifiées, et pour l'une des deux, les embryons se sont développés suffisamment longtemps pour qu'une polydactylie puisse être observée. De manière surprenante, les gènes mutés codent des protéines similaires à celles impliquées dans des transports de matériel à l'intérieur des flagelles (une version plus longue des cils), et connues pour être requises pour la croissance et le maintien de ceux-ci chez l'algue unicellulaire Chlamydomonas. Par la suite, des mutations des gènes codant des sous-unités des moteurs protéiques intraflagellaires, la dynéine et la kinésine, ont été identifiées comme causant des défauts de la signalisation Shh, confirmant ainsi l'importance des cils pour la signalisation Hedegehog chez les vertébrés.

Toutes les mutations connues qui empêchent la formation du cil primaire provoquent des anomalies de formation des membres et du tube neural. En l'absence de cil primaire, les fonctions de Gli activateur et Gli répresseur sont abolies. Vu l'importance de Gli répresseur dans l'organisation antéro-postérieure du membre, cela conduit à de la polydactylie, alors que dans le tube neural, cela conduit à une dorsalisation à cause de l'importance de Gli activateur dans la régionalisation dorso-ventrale de cette structure (Section 12.7).

Des défauts dans la formation des cils et des corps basaux ont été associés à de nombreuses maladies congénitales humaines, collectivement appelées **ciliopathies**. Les patients avec le syndrome de Bardet-Beidl (SBB), lié à des défauts du cil primaire, présentent ainsi une série d'anomalies qui incluent des polydactylies, des dysfonctionnements du rein et des pertes de l'audition. Une mutation dans 11 gènes différents peut provoquer le SBB, et certains de ces gènes codent des protéines qui font partie du corps basal et/ou du centrosome, ce qui explique les défauts de ciliogenèse que ces mutations provoquent.

11.12 Des interprétations différentes de signaux de position identiques donnent naissance à des membres différents

Les signaux, FGF et Shh par exemple, qui contrôlent la croissance et la mise en place de l'organisation du bourgeon de membre, sont les mêmes dans la patte et l'aile du poulet, mais sont interprétés différemment. La ZPA d'un bourgeon d'aile greffée dans la région antérieure d'un bourgeon de patte, induit une duplication en miroir des doigts, mais les doigts qui se forment sont des orteils et pas des doigts d'aile. Les signaux sont, de même, conservés au sein des vertébrés : un AER de souris greffé à la place de l'AER d'un poulet envoie les bons signaux pour que le bourgeon de membre se développe correctement. Les signaux sont néanmoins interprétés en fonction de l'origine des cellules qui répondent au signal : la ZPA d'un bourgeon de membre de souris greffée dans la partie antérieure d'un bourgeon d'aile de poulet provoque la formation de structures alaires additionnelles et non de doigts de souris (Section 11.7). Les signaux issus des différentes régions polarisantes sont donc les mêmes, mais selon la constitution génétique et l'historique des cellules du bourgeon de membre qui y

Fig. 11.18 Des cellules de la partie proximale d'un bourgeon de patte de poulet greffées en position distale sur un bourgeon d'aile, acquièrent des valeurs positionnelles distales. Des tissus proximaux d'un bourgeon de patte, qui normalement forment la cuisse, sont greffés à l'extrémité distale d'un bourgeon d'aile, sous l'AER. Ce tissu acquiert des valeurs de position plus distales et les interprète en formant des structures de patte, c'est-à-dire des doigts avec une griffe à l'extrémité de l'aile.



répondent, les signaux sont interprétés différemment, ce qui est révélé par les structures formées.

Une démonstration supplémentaire de l'interchangeabilité des signaux de position vient de greffes de tissus de bourgeon de membre à des positions différentes le long de l'axe proximo-distal du bourgeon. Si un tissu issu de la région proximale d'un bourgeon de patte, et qui normalement se développe en tissu de cuisse, est greffé à l'extrémité distale d'un bourgeon d'aile, il produit des orteils avec des griffes (Fig. 11.18). Le tissu a acquis une valeur de position plus distale après la transplantation, mais interprète cette valeur en fonction de son propre programme de développement, qui est de former des structures de patte. Comme cela fut évoqué précédemment, le facteur de transcription Pitx1 est impliqué dans ce «programme de type patte, comme des orteils et des griffes.

11.13 Les gènes Hox interviennent à de multiples reprises dans le développement des membres

Les gènes Hox spécifient la position des cellules le long de l'axe antéro-postérieur des vertébrés (Section 5.10) et ces gènes sont plus tard également utilisés lors du développement des membres. Les gènes Hox sont impliqués dans l'établissement de la ZPA et l'expression de ces gènes, dépendante de la position dans le membre en formation, est associée à la formation de structures le long de l'axe proximo-distal, notamment les doigts. Au moins 23 gènes Hox différents sont exprimés pendant le développement des membres de la souris et du poulet. Une attention particulière a été portée aux gènes des complexes Hoxa et Hoxd (Encart 5E) car les gènes en 5' de ces complexes sont fortement exprimés dans les membres.

L'expression des gènes en 5' des complexes Hoxa et Hoxd change au cours du développement du membre. Précocement, *Hoxd9* et *Hoxd10* sont exprimés dans le mésoderme des lames latérales au moment où il s'épaissit pour former un bourgeon de membre. L'expression de *Hoxd11*, *Hoxd12* et *Hoxd13* est ensuite rapidement initiée dans des domaines progressivement plus restreints centrés sur la région postérieure et distale des bourgeons des membres antérieurs et postérieurs. Ces domaines s'allongent ensuite au cours de la croissance du bourgeon de membre, comme cela est montré pour le bourgeon d'aile de poulet dans la Fig. 11.19 (en haut). L'expression des gènes *Hoxa9–13* débute un rien plus tard dans le bourgeon précoce, en étant organisée de manière similaire en domaines d'expression qui se chevauchent le long de l'axe proximo-distal (mais sans inclinaison postérieure), et qui s'étendent dans le bourgeon lors de sa croissance (Fig. 11.19, en bas). *Hoxa9* est exprimé dans tout le

bourgeon de membre et les gènes suivants sont exprimés dans des régions de plus en plus distales : *Hoxa11* est fortement exprimé dans la région intermédiaire du membre de même que *Hoxd11*, et *Hoxd13* ainsi que *Hoxa13* sont exprimés dans la région distale du membre.

Au moment où les doigts commencent à se former, une seconde phase d'expression des gènes Hoxd débute dans la partie distale du membre, avec *Hoxd13* qui s'exprime le premier dans toute la région qui forme les doigts, et des domaines d'expression progressivement plus petits des gènes *Hoxd12–10 qui* s'installent successivement dans cette région, sauf dans sa partie la plus antérieure. Ces gènes Hoxd et le gène *Hoxa13* sont impliqués dans la formation des doigts. La région de non-expression des gènes Hoxd entre le domaine de forte expression de gènes tel que *Hoxd10* dans la région intermédiaire du membre et le domaine de forte expression des gènes Hoxd dans la palette de la main, correspond à la zone de formation du poignet et de la cheville.

Des analyses génétiques chez la souris, combinées à des études des modifications post-traductionnelles des histones associées à l'activité transcriptionnelle et à la conformation de la chromatine (Encart 8A), ont permis d'identifier des éléments *cis*-régulateurs dans des régions, appelées « déserts géniques », qui s'étendent sur environ 1 Mb de part et d'autre des complexes Hoxd et Hoxa. Ces éléments régulateurs stimulent les deux phases d'expression des gènes Hox dans le membre. Ces déserts géniques sont conservés dans les génomes de vertébrés, et d'autres régions de ce type existent à d'autres endroits du génome et exercent des fonctions importantes dans la régulation de l'expression des gènes.

Une même logique régulatrice gouverne l'expression des gènes des deux complexes dans le membre en développement, et seul sera détaillé ici ce qui concerne le complexe Hoxd. Deux *enhancers* situés dans le désert génique localisé du côté du complexe qui est le plus proche du télomère (en 3' par rapport au complexe) contrôlent l'expression des gènes Hoxd dans le bourgeon de membre précoce, alors que plus tardivement plusieurs *enhancers* localisés du côté du complexe le plus proche du centromère (en 5' par rapport au complexe) contrôlent l'expression des gènes Hoxd dans les tissus qui forment les doigts (Fig. 11.20).

Il y a donc pendant le développement du membre une transition de la régulation de l'expression génique contrôlée successivement par des *enhancers* télomériques puis centromériques, qui fait que des gènes non situés en périphérie du complexe, comme *Hoxd10*, sont exprimés dans deux domaines distincts, d'abord dans la partie intermédiaire du membre et plus tard dans sa partie distale (Fig. 11.19). La





Proximal Distal

Fig. 11.19 Profils d'expression des gènes Hox dans le bourgeon d'aile précoce du poulet. Les gènes Hoxd (en haut) sont exprimés dans des profils emboîtés centrés sur l'extrémité postérieure du bourgeon alaire. *Hoxd13* est exprimé le plus postérieurement et le plus distalement. Les gènes Hoxa (en bas) acquièrent également des profils emboîtés le long de l'axe proximo-distal, *Hoxa11* étant exprimé le plus distalement.

Fig. 11.20 Des enhancers télomériques et centromériques contrôlent l'expression des gènes Hoxd dans le membre en développement de la souris. En haut : dans les cellules du bourgeon de membre précoce, les enhancers (en orange) du désert génique situé du côté télomérique du complexe Hoxd, sont mis en contact avec des gènes du complexe grâce à une boucle chromosomique, activent leur expression (vert) et contrôlent la première phase d'expression des gènes Hox, comme cela est illustré pour Hoxd10 (encart en haut à droite). En bas : dans les cellules qui vont former les doigts, les enhancers (en violet) du désert génique situé du côté centromérique du complexe Hoxd sont mis en contact avec les gènes de la partie 5' du complexe et contrôlent la seconde phase d'expression des gènes Hox, comme cela est illustré pour Hoxd10 (en bas à droite). L'expression de Hoxd10 est donc contrôlée par les deux ensembles d'enhancers mais selon des profils différents.

D'après Andrey, G., et al. : A switch between topological domains underlies HoxD genes collinearity in mouse limbs. Science 2013, 340 : 1234167.



Fig. 11.21 Domaines d'action des gènes Hox dans la mise en place de l'organisation du membre antérieur de la souris. Les régions colorées indiquent les régions dans lesquelles les gènes Hox influencent l'organisation proximo-distale du membre, comme cela a été déterminé grâce à des expériences d'invalidation génique. Les gènes des groupes de paralogie Hox9 (en rouge) et Hox10 (en orange foncé) agissent ensemble dans l'humérus, les gènes Hox10 ayant également une fonction dans le radius et l'ulna (en orange clair). Les gènes du groupe de paralogie Hox11 sont pour la plupart impliqués dans la formation de cette région (en jaune foncé) et influencent aussi la formation du poignet et des doigts (en jaune clair). Les gènes du groupe de paralogie Hox12 contrôlent principalement la formation du poignet (en vert foncé), bien que l'activité de Hoxd soit faible ici, et les gènes du groupe de paralogie Hox13 contrôlent celle de la main (en violet). MC, métacarpe ; P, phalange.

D'après Wellik, D.M., Capecchi, M.R. : Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. Science 2003, 301 : 363-367. délétion un à un de chacun des *enhancers* centromériques montre que seule la délétion de l'ensemble des éléments régulateurs abolit entièrement l'expression de Hoxd dans la partie distale du membre, ce qui souligne la complexité de cette régulation génique.

L'expression des gènes Hox dans le membre est impliquée dans l'établissement de la ZPA. Une délétion conditionnelle de tous les gènes Hoxa et Hoxd dans le bourgeon de membre antérieur précoce conduit à l'absence d'expression de *Shh* et à des troncatures sévères des membres. À l'inverse, l'expression de *Hoxd13* dans la totalité du bourgeon de membre précoce, alors qu'elle est normalement restreinte à la partie postérieure, provoque, outre son expression postérieure, une expression ectopique de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon, et la formation de membres avec des duplications en miroir. Ceci peut aussi être réalisé en provoquant une inversion du complexe Hoxd de telle manière que les gènes de la partie 5' du complexe soient exprimés selon le patron des gènes de la partie 3'. *Hoxb8*, un des rares gènes Hox autres que ceux des complexes Hoxa et Hoxd, à s'exprimer dans le membre antérieur, semble lui aussi impliqué dans le contrôle de l'expression de *Shh*.

Comme indiqué précédemment, la séquence proximo-distale d'expression des gènes Hoxa et Hoxd correspond de manière générale aux trois principales régions du membre le long de l'axe proximo-distal. *Hoxa9* et *Hoxd9* sont exprimés dans la région proximale du membre antérieur, où se forme l'humérus. *Hoxa11* et *Hoxd11* sont exprimés dans la région où se constituent le radius et l'ulna, alors que *Hoxa13* et *Hoxd13* (avec *Hoxd10–Hoxd12*) sont exprimés dans la région où se forment les doigts. On retrouve des profils d'expression globalement similaires dans les membres antérieurs et postérieurs, même s'il y a de petites différences.

La fonction d'un gène ne peut pas être uniquement déduite à partir de son profil d'expression et des analyses génétiques sont nécessaires pour établir sa fonction. Il doit ainsi être déterminé si l'altération de l'expression des gènes Hox dans le membre conduit à des transformations homéotiques comme c'est le cas au niveau des vertèbres suite à des *knock-out* de gènes Hox (Section 5.7). Les phénotypes au niveau du membre provoqués par le *knock-out* des gènes Hox chez la souris sont difficiles à interpréter, mais ils montrent que ces gènes influencent la formation des différentes parties du membre dans lesquelles ils sont exprimés (Fig. 11.21). Cette conclusion est basée sur le phénotype de souris mutantes pour les gènes d'un même groupe de paralogie. Par exemple, le groupe Hox10 contrôle la formation du radius et de l'ulna dans le membre antérieur (tibia et péroné dans le membre postérieur). L'inactivation des gènes du groupe Hox13 affecte le développement des doigts, ce qui est cohérent avec l'expression de *Hoxd13* et *Hoxa13* dans la partie distale du membre.

Des mutations des gènes HOX de l'espèce humaine sont associées à des malformations des membres. Ainsi, des mutations du gène *HOXD13* conduisent à la fusion des doigts et à certains types de **polydactylie**, alors que des mutations de *HOXA13* provoquent le syndrome main-pied-utérus caractérisé notamment par un raccourcissement des doigts et orteils.

Des analyses génétiques récentes chez la souris ont révélé une fonction insoupçonnée des gènes Hox exprimés dans la palette de la main, concernant la régulation de l'espacement des doigts. Dans les bourgeons de membre élargis des souris mutantes pour Gli3, dans lesquels il n'y a pas d'informations de position antéro-postérieures, de nombreux doigts indistincts se forment et les gènes Hox sont exprimés dans toute la région du membre où se forment les doigts. Si chez ces mutants *Gli3*, ces gènes Hox (*Hoxa13* et *Hoxd11–Hoxd13*) sont progressivement supprimés, le nombre de doigts augmente progressivement, quoique la palette de la main ne change pas de taille. Chez des souris mutantes pour Gli3 chez lesquelles les gènes *Hoxd11–13* sont inactivés et ne subsiste qu'un seul exemplaire de *Hoxa13*, la palette de main comporte de 12 à 14 doigts très resserrés. Ces données suggèrent que la formation des doigts est basée sur un système d'auto-organisation qui dépend d'un mécanisme de **réaction-diffusion** (Encart 11E) régulé par les gènes Hox et qui assure que le bon nombre de doigts se forme.

11.14 L'auto-organisation pourrait être impliquée dans le développement du bourgeon de membre

La capacité d'auto-organisation du membre en développement, décrite chez la souris dans la section précédente, peut être mise en évidence par des manipulations expérimentales chez le poulet. Des cellules dissociées à partir d'un bourgeon de membre et ensuite réassociées développent des doigts, même en l'absence de la ZPA. Pour ce faire, des cellules mésodermiques dissociées à partir d'un bourgeon de membre précoce sont fortement mélangées afin de disperser la zone polarisante, ou sont prélevées uniquement à partir de la région antérieure du bourgeon de membre afin de ne pas avoir de cellules de la ZPA. Ces cellules enveloppées de cellules ectodermiques (préparées comme décrit dans la Section 11.10) sont ensuite greffées dans une région pouvant fournir un apport sanguin, par exemple la surface dorsale d'un membre plus âgé, qui est neutre en terme de signaux de polarisation. Le greffon produit des structures de type membre malgré l'absence de la ZPA. Dans la partie proximale de ces membres "recombinés", de longs éléments cartilagineux peuvent se former mais ceux-ci ne peuvent pas se comparer facilement à des structures normales. Plus distalement, le greffon forme des orteils identifiables (Fig. 11.22). Le fait que des éléments cartilagineux bien formés puissent se développer en l'absence de la ZPA bien définie montre que le bourgeon a une forte capacité d'auto-organisation. On peut même obtenir la formation de structures de type membre en greffant des cellules mésodermiques dissociées à partir de bourgeons de membre, puis mises en culture pendant plusieurs jours et insérées au sein d'une enveloppe de cellules ectodermiques.

Ces résultats suggèrent que le bourgeon de membre pourrait être capable de générer un modèle de base, un **pré-patron**, constitué d'éléments cartilagineux équivalents. Il correspondrait à une ébauche d'organisation générée de manière autonome dans l'embryon et pouvant être identifiée avant le développement plus tardif d'une organisation similaire des structures. L'organisation finale des structures ne suit pas forcément de manière exacte l'ébauche préalable mais peut en être une forme modifiée. Les éléments cartilagineux équivalents du pré-patron du membre peuvent se voir attribuer leurs identités qui seront affinées en réponse aux informations de position dues à des signaux comme Shh et à l'activation de l'expression de gènes Hox et de leurs cibles (Sections 11.8 et 11.13).

Le mécanisme qui permet de générer le pré-patron de structures répétées peut être basé sur un mécanisme de réaction-diffusion. Dans ce modèle, la polydactylie pourrait simplement résulter de l'élargissement du bourgeon de membre. Si un mécanisme de réaction-diffusion produit une disposition périodique des éléments cartilagineux dans le membre alors que les doigts se forment, un simple élargissement du bourgeon sans altération de la périodicité, suite à un petit incident du développement, pourrait être à l'origine d'un doigt surnuméraire (Encart 11E).

Fig. 11.22 Des cellules reagrégées de bourgeon de membre forment des doigts en l'absence d'une zone à activité polarisante (ZPA) localisée. Des cellules mésodermiques d'un bourgeon de patte de poulet sont dissociées, y compris les cellules de la ZPA, mélangées afin de les disperser, et réagrégées. Elles sont ensuite placées dans un manteau ectodermique et greffées dans un site neutre. Des doigts complets se forment distalement.





ENCART 11E Les mécanismes de réaction-diffusion











Figure 3

Tiré de Meinhardt, H. : **Turing's theory** of morphogenesis of 1952 and the subsequent discovery of the crucial role of local self-enhancement and longrange inhibition. Interface Focus 2012, 2 : 407-416.



Figure 4

Tiré de Sheth, R., et al. : **Hox genes regulate digit patterning by controlling the wavelength of a Turing-type mechanism**. Science 2012, **338** : 1476-1480. Certains systèmes chimiques, comme la fameuse réaction de Belousov-Zhabotinsky, s'auto-organisent et génèrent spontanément des patrons spatiaux de concentration de leurs composants. La distribution initiale des molécules est uniforme, mais avec le temps le système forme des patrons en expansion ressemblant à des vagues. Ce type de système peut être modélisé mathématiquement avec des réactions chimiques entre deux ou plusieurs molécules avec des taux différents de diffusion. Ces systèmes sont nommés **systèmes à réaction-diffusion** ou **structures de Turing**, du nom du mathématicien Alan Turing qui fut le premier à démontrer que des organisations répétées simples peuvent être produites de cette manière.

Considérons par exemple un système fermé composé d'un activateur et d'un inhibiteur, dans lequel l'activateur active sa propre synthèse et celle de l'inhibiteur. Ce dernier inhibe la synthèse de l'activateur et diffuse plus vite que l'activateur (Figure 1). Un type d'inhibition latérale a lieu de telle manière que la synthèse de l'activateur devient confinée à une région, formant un pic de concentration de l'activateur avec une certaine longueur d'onde. Si celle-ci ne change pas alors que la taille du système augmente, un second pic apparaît, puis un troisième et ainsi de suite tant que le système augmente de taille (Figure 2). Dans un système à deux dimensions, un profil de pics de concentration élevée de l'activateur peut se développer comme celui montré dans la Figure 3. À l'inverse, si la taille du système ne varie pas, une diminution de la longueur d'onde est requise pour générer plus de pics.

Les mécanismes de réaction-diffusion ont intéressé les biologistes car ils peuvent en théorie, avec des conditions et constituants appropriés, générer des patrons périodiques de taches et de bandes, par exemple, chez les animaux (Encart 11E en ligne avec des éléments supplémentaires), ou de structures répétées comme les sépales et les pétales des fleurs.

Le membre a des capacités importantes d'auto-organisation et il a été suggéré que des mécanismes de réaction-diffusion pourraient générer la disposition périodique d'éléments squelettiques comme les doigts. Dans la palette de la main d'une souris normale (Figure 4, à gauche), cinq bandes de cellules exprimant le gène *Sox9* se déploient du poignet vers l'extrémité distale plus large de la palette de la main, préfigurant la position des cinq doigts. Dans un système de réaction-diffusion, ces bandes représenteraient les concentrations élevées de l'activateur et la disposition de ces bandes serait mise en place en changeant l'espacement entre les bandes afin qu'il soit plus important distalement que proximalement, empêchant ainsi la division de la bande en deux à l'extrémité plus large de la palette de la main.

Chez les souris mutantes pour le gène *Gli3* (Section 11.8), la palette de la main est plus large et, comme il est prédit dans un système de réaction-diffusion, il y a une

augmentation du nombre de bandes de cellules exprimant *Sox9*, qui se déploient depuis le poignet comme dans un membre normal. S'il y a moins de gènes Hox exprimés dans la palette de la main de souris déficiente pour le gène *Gli3*, de nombreuses bandes d'expression de Sox9 sont produites dans la palette de la main dont la taille ne change néanmoins pas. Certaines de ces bandes montrent des bifurcations distales (Figure 4, à droite). Ce patron des bandes correspond à celui prédit théoriquement pour un système de réaction-diffusion dans lequel les gènes Hox modulent la production de l'inhibiteur et donc diminuent la longueur d'onde de l'espacement des pics.

11.15 L'organisation de la musculature du membre est contrôlée par le tissu conionctif

Les cellules musculaires des membres ont une origine différente de celle des cellules des tissus conjonctifs, y compris les tissus conjonctifs associés aux muscles. Si des somites de caille sont greffés dans un embryon de poulet à un site opposé à celui où se forme le bourgeon d'aile, l'aile qui se formera aura des muscles provenant de la caille, mais toutes les cellules conjonctives viendront du poulet. Les cellules qui produisent les muscles du membre migrent depuis les somites vers le bourgeon précoce de membre, sous forme de myoblastes (Section 5.13). Après migration, les myoblastes se multiplient et forment initialement des blocs dorsaux et ventraux de muscles présomptifs (Fig. 11.23). Ces blocs subissent une série de divisions et forment les muscles individuels. Les myoblastes en migration ne peuvent pénétrer que dans la région dorsale ou ventrale, et ne traversent jamais la frontière entre les compartiments ventraux et dorsaux, celle-ci étant caractérisée par l'expression uniquement dorsale de Lmx1b (Fig. 11.16). Les cellules musculaires présomptives n'acquièrent pas, du moins initialement, des valeurs de position comme les cellules cartilagineuses et conjonctives, et sont toutes équivalentes. Des travaux récents montrent néanmoins que Shh pourrait contrôler directement la différentiation myogénique de la masse musculaire ventrale, ces muscles ne se formant pas en l'absence de signalisation Shh.

L'équivalence initiale des myoblastes a été montrée chez des embryons précoces de poulet par des expériences de remplacement des somites contribuant à la formation des ailes par ceux de la future région du cou. Les myoblastes qui entrent dans le bourgeon de l'aile viennent donc de somites de la région du cou, mais, malgré cela, la musculature du membre se forme normalement. Cela montre que le patron des muscles dépend du tissu conjonctif dans lequel migrent les myoblastes et non des myoblastes eux-mêmes. Le tissu conjonctif associé au muscle présomptif pourrait avoir des propriétés de surface ou d'adhésion cellulaire reconnues par les myoblastes et qui les atttirent. Le changement de ces propriétés au cours du temps pourrait modifier la migration des myoblastes, ce qui pourrait influencer la subdivision des masses musculaires. L'expression des gènes Hox pourrait être induite dans les myoblastes par le mésenchyme environnant. Hoxa11 est exprimé dans les myoblastes qui entrent dans le membre, alors que les cellules de la région postérieure des masses musculaires dorsales et ventrales expriment Hoxa13. Les profils d'expression des gènes Hox dans les myoblastes diffèrent de ceux du mésenchyme environnant, ce qui pourrait signifier que les myoblastes ont acquis leurs propres valeurs de position.

Les myoblastes qui prolifèrent dans le membre expriment Pax3. Quand l'expression de ce gène diminue, la prolifération cellulaire s'arrête et les cellules se différencient (Section 8.5). Des signaux provenant de l'ectoderme adjacent, notamment BMP-4, empêchent une différenciation prématurée. Les tendons en développement sont caractérisés par l'expression de *Scleraxis* qui code un facteur de transcription.

11.16 Le développement initial des cartilages, des muscles et des tendons est autonome

Une greffe de la ZPA conduit à une duplication en miroir de tous les éléments du membre, éléments squelettiques, muscles et tendons (Fig. 11.23). Cela veut dire que la formation de ces trois types d'éléments est contrôlée par le même ensemble de

Fig. 11.23 Le développement des muscles dans l'aile du poulet. Une coupe transversale de l'aile dans la région du radius et de l'ulna peu de temps après la formation du cartilage, montre que les cellules musculaires présomptives forment deux masses, ventrale et dorsale (en haut). Ces masses subissent ensuite une série de divisions et donnent naissance à des muscles individuels. La greffe de la ZPA dans la région antérieure du bourgeon alaire provoque une duplication en miroir des muscles (en bas).

D'après Shellswell, G.B., Wolpert, L. : The pattern of muscle and tendon development in the chick wing. In Limb and Somite Morphogenesis. Eds Ede, D.A., Hinchliffe, J.R., Balls, M. Cambridge : Cambridge University Press, 1977.



Version étendue de l'Encart 11 E





signaux et qu'il y a peu ou pas de communications entre eux. Le développement de chaque type d'élément est autonome. Si l'extrémité distale d'un bourgeon d'aile précoce de poulet est retirée et greffée sur le flanc d'un embryon receveur, il forme au début des structures distales normales telles un poignet et trois doigts. Le long tendon qui s'étend normalement le long de la face ventrale du doigt 3 commence à se développer, même si son extrémité proximale et les muscles auxquels il s'attache sont absents. Cependant, le tendon arrête de se développer car il n'établit pas la connexion nécessaire avec le muscle et n'est donc pas mis sous tension. Le mécanisme par lequel les connexions entre tendons, muscles et cartilages sont établies, n'est pas encore connu. Il est néanmoins clair qu'il n'y a pas ou peu de réelles spécificités dans ces connexions : si l'extrémité d'un membre en développement est inversée dorso-ventralement, les tendons dorsaux et ventraux peuvent se connecter à des muscles et tendons inappropriés. Ils font simplement des connexions avec les muscles et tendons les plus proches de leurs extrémités libres.

11.17 La formation des articulations nécessite des signaux sécrétés et des stimuli mécaniques

La première étape de la formation d'une articulation est l'établissement d'une « interzone » au site de la future articulation, dans laquelle les cellules cartilagineuses deviennent des cellules de type fibroblastique et cessent de produire de la matrice cartilagineuse, ce qui sépare entre eux les éléments cartilagineux (Fig. 11.24). À ce stade, les gènes Wnt9A (anciennement appelé Wnt14) et Gdf5 (apparenté aux gènes Bmp) sont exprimés dans la région de la future articulation. L'expression ectopique de Wnt9A peut induire les premières étapes de la formation de l'articulation et certaines articulations ne se forment pas chez des souris déficientes pour le gène Gdf5. Un peu plus tard, la musculature commence à fonctionner et des contractions musculaires surviennent. Les cellules de l'interzone produisent de grandes quantités d'acide hyaluronique qui lubrifie les surfaces des articulations ; la coalescence des vésicules dans lesquelles celui-ci est sécrété est à l'origine de la cavité articulaire.

Dans des embryons de poulet chez lesquels l'activité musculaire a été inhibée grâce à des inhibiteurs pharmacologiques, les articulations fusionnent, montrant que leur formation dépend de stimulations mécaniques provenant des contractions musculaires. Celles-ci stimulent la synthèse d'acide hyaluronique. Des cellules de l'interzone isolées et mises en culture, répondent à des stimulations mécaniques en augmentant



Fig. 11.24 Formation d'une articulation. Des sections d'une articulation interphalangienne proximale d'une patte d'un embryon de poulet, colorées au bleu de toluidine, montrent les différentes phases de son développement. L'apparition d'une interzone contenant des cellules fibroblastiques entre deux éléments squelettiques cartilagineux est le premier signe morphologique de la formation de l'articulation (à gauche). Les cellules de cette région expriment *Wnt 9*

et *GDF 5*. La cavité de l'articulation (au milieu) commence à se former quand les cellules de l'interzone sécrètent de l'acide hyaluronique. L'articulation finale (à droite) a une cavité continue entre les surfaces articulaires des deux éléments cartilagineux. Barre d'échelle = 50 μm. *Photographies aimablement communiquées par A.S. Pollard et A.A. Pitsillides.*



leur sécrétion d'acide hyaluronique quand le substrat sur lequel elles sont attachées est étiré. Chez des souris mutantes dont les muscles sont incapables de se contracter ou chez lesquelles les muscles du membre sont absents, certaines articulations (mais pas toutes) sont fusionnées. Dans les interzones à l'origine des articulations affectées, la signalisation Wnt est réduite et les cellules se différencient en cellules cartilagineuses et non en cellules d'articulation.

11.18 La séparation des doigts résulte de morts cellulaires programmées

L'apoptose (Encart 6A) a un rôle essentiel dans le modelage de la forme des membres des mammifères et du poulet, en particulier des doigts. La palette de la main dans laquelle les doigts se forment est aplatie dans l'axe dorso-ventral. Les éléments cartilagineux des doigts se forment à partir de condensations de cellules mésenchymateuses à des positions spécifiques de la palette de la main où est exprimé le gène *Sox9* (Encart 11E). Ce gène contrôle la différentiation des cellules cartilagineuses. La séparation des doigts dépend alors de la mort des cellules situées dans les régions interdigitales entre les éléments cartilagineux (Fig. 11.25). Cette mort nécessite la signalisation BMP : si la fonction des récepteurs des BMP est bloquée dans une patte de poulet en cours de formation, la mort cellulaire est inhibée et les doigts ne se séparent pas. D'autres signaux sont également impliqués : ainsi FGF-8 provenant de l'ectoderme adjacent constitue un "signal de survie" pour les cellules interdigitales et c'est la balance entre signaux de mort et de survie qui assure la bonne localisation et étendue de la mort cellulaire.

La mort cellulaire programmée est un aspect normal du développement. Le fait que les canards ou autres oiseaux aquatiques ont des pattes palmées, et pas les poulets, est le résultat d'une faible mort cellulaire entre les doigts des oiseaux aquatiques. Si du mésoderme de patte de poulet est recombinée avec de l'ectoderme de patte de canard, la mort cellulaire entre les doigts est diminuée et les pattes sont palmées (Fig. 11.26). C'est le mésoderme qui détermine le patron de mort cellulaire à la fois dans le mésoderme et l'ectoderme qui le recouvre. Chez les amphibiens, la séparation des doigts n'est pas due à la mort cellulaire, mais résulte d'une croissance plus importante des doigts par rapport à celle des régions interdigitales.

La mort cellulaire programmée survient également dans d'autres régions du membre en formation, par exemple la marge antérieure du bourgeon de membre et entre le radius et l'ulna. Chez le poulet, la mort cellulaire existe aussi dans la ZPA. En effet, c'est l'étude de la mort cellulaire dans cette région *via* la transplantation de celle-ci dans la région antérieure du bourgeon de membre qui a conduit à la découverte de son activité organisatrice. Une hypothèse quant au rôle de la mort cellulaire dans la ZPA est qu'elle contrôlerait le nombre de cellules exprimant *Shh*.

Fig. 11.26 Le mésoderme détermine le patron de la mort cellulaire. Dans la patte palmée en développement du canard et d'autres oiseaux aquatiques, il y a moins de mort cellulaire entre les doigts que chez les oiseaux dont les pattes ne sont pas palmées. Si le mésoderme et l'ectoderme de bourgeons de membre de poulet et de canard sont échangés, la palmure se développe uniquement si du mésoderme de canard est présent.

Fig. 11.25 Morts cellulaires pendant le développement de la patte du poulet. Une mort cellulaire programmée dans les régions interdigitales provoque la séparation des orteils. Barre d'échelle = 1 mm.

Photographie reproduite avec

l'autorisation de Garcia-Martinez, V., et al. : Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of embryonic chick leg bud. J. Cell Sci. 1993, **106** : 201-208. Publié avec l'autorisation de The Company of Biologists Ltd.



RÉSUMÉ

Le positionnement et la mise en place de l'organisation du membre des vertébrés sont largement réalisés grâce à des interactions cellulaires qui fournissent aux cellules une information de position. Les sites où les bourgeons de membre se forment le long de l'axe antéro-postérieur du corps sont déterminés par un code combinatoire d'expression des gènes Hox dans le mésoderme des lames latérales. Il y a deux régions signalisatrices essentielles dans le bourgeon de membre. L'une est la crête apicale ectodermique ou AER, qui produit des signaux de type FGF requis pour la croissance du bourgeon qui implique des mouvements et divisions cellulaires orientés. L'autre est la zone à activité polarisante ou ZPA, située à la bordure postérieure du bourgeon, produisant la protéine Shh qui, distribuée sous la forme d'un gradient, constitue un signal de position contrôlant la mise en place de l'axe antéro-postérieur du membre. La quantité de signal Shh et la durée de cette signalisation déterminent l'identité des doigts. L'organisation du membre selon l'axe dorso-ventral est spécifiée par l'ectoderme.

Les signalisations le long des trois axes du membre sont intégrées au sein d'un réseau qui comprend des boucles de rétroaction négative et positive. Les gènes Hox sont exprimés dans le bourgeon de membre dans des profils d'expression spatio-temporaux complexes et exercent plusieurs fonctions dont l'établissement de la ZPA et la spécification des identités le long de l'axe proximo-distal. Les gènes Hox régulent également l'espacement des doigts au sein de la palette de la main. Les cellules musculaires du membre migrent depuis les somites et leur développement au sein du bourgeon de membre dépend du tissu conjonctif du membre. La disposition périodique des éléments cartilagineux du membre pourrait impliquer des mécanismes d'auto-organisation. La formation des articulations nécessite la production locale de molécules de signalisation et des *stimuli* mécaniques. Chez les mammifères et les oiseaux, la séparation des doigts se fait par mort cellulaire programmée..



Les pattes et les ailes des insectes

Les organes adultes et les appendices de la drosophile se développent à partir de disques imaginaux qui constituent d'excellents systèmes expérimentaux pour étudier le développement (Fig. 2.6). Les disques s'invaginent à partir de l'ectoderme embryonnaire sous forme de simples poches épithéliales et restent ainsi jusqu'au moment de la métamorphose (Fig. 2.1). Bien que tous les disques imaginaux se ressemblent superficiellement, ils se développent différemment en fonction du segment dans lequel ils résident. Les disques imaginaux à l'origine des ailes et des pattes sont situés dans les segments thoraciques. Ils sont spécifiés comme disque d'aile ou de patte dans l'épithélium embryonnaire au moment où les segments se forment et acquièrent leur identité. Les ailes se développent au niveau du second segment thoracique, les haltères (ou balanciers qui équilibrent la mouche pendant son vol) se forment sur le troisième segment thoracique et les pattes se développent dans les trois segments thoraciques. Les disques d'aile et de patte se forment dans l'embryon sous forme d'amas de 20 à 40 cellules et croissent d'un facteur 1 000 pendant le développement larvaire.

Une propriété des disques imaginaux est que si certaines de leurs cellules sont retirées ou détruites, le disque peut récupérer une taille normale et se développer normalement. Ceci est également vrai si certaines cellules ont un avantage de croissance, par exemple dans la technique *Minute* (Section 2.27). Le mécanisme impliqué reste jusqu'à présent inconnu.

Bien que les ailes et les pattes des insectes possèdent des morphologies très différentes, leur formation se base sur des stratégies et mécanismes similaires. Ces mécanismes et certains des gènes impliqués, montrent aussi des similitudes avec ceux contrôlant le développement du membre des vertébrés. Ces similitudes sont probablement dues à une évolution parallèle, liée à un recrutement indépendant d'un même ensemble de gènes pour construire des structures fonctionnellement similaires et pas à une homologie entre les membres des insectes et des vertébrés. Le développement de l'aile sera tout d'abord abordé et ensuite comparé avec celui de la patte.

11.19 L'aile adulte émerge pendant la métamorphose après l'enroulement et l'évagination du disque imaginal d'aile

L'aile adulte est une structure en grande partie épidermique dans laquelle deux couches de cellules épithéliales, les surfaces dorsales et ventrales, sont apposées l'une à l'autre. L'aile se connecte à la région dorsale du thorax (appelée tergite ou notum) *via* une région charnière. Cette région, ainsi qu'une partie du tergite, dérive également du disque d'aile. À la métamorphose, à un moment où son organisation est largement établie, le disque d'aile subit de profonds changements morphologiques. La poche épithéliale se retourne au fur et à mesure que les cellules se différencient et changent de forme. Elle s'étend et se replie de telle manière qu'une moitié vient s'apposer à la seconde formant les deux surfaces de l'aile (Fig. 11.27). Les facteurs de transcription à doigts de zinc, Elbows et No-ocelli, agissent dans les disques d'aile et de patte pour réprimer les gènes spécifiant la paroi corporelle et permettent ainsi le développement des appendices.

Dans l'embryon, l'épiderme de chaque segment thoracique et des disques qui en dérivent, sont subdivisés en un compartiment antérieur et un compartiment postérieur (Section 2.24) constituant des régions cellulaires séparées par une frontière de restriction clonale. Dans le disque d'aile, une seconde frontière entre compartiments



Fig. 11.27 Représentation schématique de l'émergence de la lame alaire à partir du disque imaginal. Les futures surfaces dorsales et ventrales de l'aile sont initialement dans le même plan dans le disque imaginal (à gauche). À la métamorphose, la poche formée par le disque subit une éversion et s'étend vers l'extérieur (au milieu et à droite) ; les surfaces ventrales et dorsales de l'aile s'apposent l'une à l'autre.



Fig. 11.28 Développement et carte des territoires présomptifs du disque imaginal d'aile de la drosophile. Au moment de la formation du disque d'aile à partir de l'épiderme embryonnaire, il n'y a pas de cellules spécifiquement destinées à former l'aile. L'ébauche de l'aile émerge pendant les premiers stades de la croissance larvaire sous forme d'un petit groupe de 20-30 cellules qui prolifèrent rapidement pour former un amas cellulaire ovoïde. Le disque d'aile est coupé en deux par l'interface entre les compartiments antérieur (A) et postérieur (P; Section 2.24), représentée par une ligne pointillée. À la fin du troisième stade larvaire, la future aile est une couche épithéliale ovoïde qui correspond à environ la moitié du disque imaginal et une nouvelle frontière entre compartiments est apparue (en rouge) et sépare les futures surfaces dorsale (D, en jaune) et ventrale (V, en bleu) de l'aile. À la métamorphose, les surfaces ventrale et dorsale de l'aile s'apposent comme cela est expliqué dans la Fig. 11.27. Le disque d'aile contient également les précurseurs de la région articulaire (en gris) et du tergite (en brun).

D'après la figure 12.18 de Martinez Arias, A., Stewart, A. : Molecular Principles of Animal Development. Oxford University Press, 2002.



dorsal et ventral se met place lors du second stade larvaire (Fig. 11.28). Les parties proximales des disques d'aile et de patte donnent naissance à des parties de la paroi thoracique.

Au moment de sa formation, le disque de patte contient déjà des cellules qui produiront des parties de la patte adulte. Le disque alaire, en revanche, ne contient initialement que les cellules qui vont former le tergite et la zone charnière, mais pas celles formant l'aile proprement dite. L'ébauche de celle-ci émerge au sein du disque pendant le premier stade larvaire.

Le développement et la croissance de l'aile de la drosophile dépendent de la fonction du gène vestigial, qui code un co-activateur transcriptionnel produit uniquement dans l'aile et qui peut induire la formation de tissu alaire quand il est produit dans d'autres disques imaginaux. *vestigial* est exprimé à un taux faible dans tout le disque d'aile précoce et agit à différents stades du développement de l'aile. Son profil d'expression varie spatialement durant le développement de l'aile et est contrôlé par des éléments régulateurs distincts aux différents stades. L'initiation de la formation de l'aile coïncide avec une augmentation de l'expression de vestigial dans un petit groupe d'environ 30 cellules dans le milieu du disque, en réponse à des signaux Notch et Wingless (Fig. 11.29). Ces cellules formeront la marge de l'aile (Fig. 11.27) et initieront l'excroissance de l'aile. Wingless est un membre de la famille des protéines de signalisation sécrétées Wnt, et son rôle dans le développement embryonnaire a déjà été abordé (Section 2.26). Wingless est présent dans le disque d'aile dès les stades précoces et des mutations qui réduisent son activité conduisent à l'échec de la spécification du disque d'aile et la mouche est donc dépourvue d'aile, ce qui a justifié le nom du gène concerné.

11.20 Un centre de signalisation situé à la frontière entre les compartiments antérieurs et postérieurs organise le développement de l'aile de la drosophile selon l'axe antéro-postérieur

Les frontières entre compartiments sont des centres de signalisation qui contrôlent la mise en place de l'organisation des tissus (Section 2.24). Dans un premier temps sera envisagée la mise en place de l'organisation antéro-postérieure se produisant lors des premiers stades de la vie larvaire, et qui est contrôlée par un centre organisateur situé à la frontière entre les compartiments antérieurs et postérieurs. Le gène *engrailed* est exprimé dans le compartiment postérieur des disques imaginaux (Fig. 11.30), un

Fig. 11.29 Formation de l'ébauche de l'aile grâce à l'expression de vestigial en réponse aux signalisations Wingless et Notch. Les voies de signalisation sont utilisées pour le développement de tous les disques. Dans le disque d'aile, leur activité induit la production du co-activateur transcriptionnel Vestigial qui confère une activité "aile-spécifique" au facteur de transcription auquel il se lie. Ceci assure que, dans le disque d'aile, les effecteurs transcriptionnels des voies de signalisation activent spécifiquement l'expression de gènes impliqués dans la formation d'une aile.



profil d'expression hérité du parasegment embryonnaire duquel le disque dérive (Section 2.26). Les cellules qui expriment *engrailed* expriment également *hedgehog*.

Comme dans l'embryon, la protéine sécrétée Hedgehog agit *via* son récepteur Patched (Encart 2F) pour activer le facteur de transcription Ci (l'homologue des protéines Gli des vertébrés). Le gradient de Hedgehog s'étend sur environ 10 diamètres cellulaires, c'est-à-dire environ la moitié de la largeur du disque à ce stade précoce. La protéine Hedgehog est fortement modifiée par des lipides et c'est probablement la raison pour laquelle elle ne diffuse pas plus loin. Le facteur transcriptionnel Ci n'est produit que dans les cellules du compartiment antérieur et donc seules ces dernières peuvent répondre à Hedgehog. Au gradient de concentration de Hedgehog correspond un gradient d'activité de Ci (l'activité la plus forte étant dans les cellules proches de la frontière entre les compartiments) et cela conduit à des réponses différentielles des cellules le long de ce gradient. Hedgehog agit donc comme un morphogène.

Une des cibles de Ci est *decapentaplegic* (*dpp*), qui code une protéine de signalisation de la famille BMP (Encart 4C). En réponse au signal Hedgehog, *dpp* est exprimé dans une bande étroite de cellules antérieures qui jouxtent la frontière avec le compartiment postérieur (Fig. 11.30). La protéine Dpp est sécrétée par ces cellules et forme un gradient de concentration symétrique dans les compartiments antérieurs et postérieurs qui fournira une information de position antéro-postérieure aux cellules des deux compartiments.

La protéine Dpp diffuse sur de longues distances et contrôle, de manière dépendante de sa concentration, l'expression de gènes codant des facteurs de transcription Spalt (Sal), Optomotor-blind (Omb) et Brinker (Fig. 11.31). Ce sont ces facteurs de transcription qui vont médier la fonction de Dpp et affiner l'organisation de l'aile. Dpp agit donc comme un morphogène (Fig. 11.32) : en faible quantité, Dpp active l'expression de *omb*, alors que celle de *spalt* nécessite de plus grandes quantités de



Fig. 11.31 Les domaines d'expression génique induite par la signalisation Decapentaplegic (Dpp) organisent le disque d'aile de la drosophile. (a) expression de *dpp* (en bleu) à la frontière antéropostérieure du disque. (b) la signalisation Dpp réprime l'expression de *brinker* (en vert) qui est exprimé uniquement dans deux domaines, de part et d'autre de la zone d'expression de *dpp*. (c) et (d) les gènes *spalt* (en rouge) et *omb* (en bleu) sont exprimés dans une large bande de cellules, centrée sur la frontière antéro-postérieure où *brinker* ne s'exprime pas. Brinker réprime l'expression de *spalt* et *omb*. (e) superposition de (b), (c) et (d).

(a) photographie reproduite avec l'autorisation de Nellen, D., et al. : **Direct and long-range action of a dpp morphogen gradient**. Cell 1996, **85 :** 357-368. © 1996, Cell Press.

(b-e) photographies reproduites avec l'autorisation de Moser, M. and Campbell, G. : Generating and interpreting the Brinker gradient in the Drosophila wing. Dev. Biol. 2005, 286 : 647-658.

Fig. 11.30 Établissement d'un centre de signalisation dans le disque d'aile à la frontière des compartiments antérieur et postérieur. Le gène *engrailed* est exprimé dans le compartiment postérieur, où les cellules expriment également *hedgehog* et sécrètent la protéine Hedgehog. Les cellules antérieures recevant le signal Hedgehog expriment *decapentaplegic*, et Decapentaplegic est sécrétée dans les deux compartiments (flèches noires).



Film montrant la formation du gradient Dpp



Fig. 11.32 Un modèle de mise en place de l'organisation antéro-postérieure du disque d'aile. La protéine Decapentaplegic (Dpp) est produite à la frontière des compartiments antérieur et postérieur. La coupe schématique du disque d'aile (X-Y) le long de l'axe antéro-postérieur, montre comment le gradient de concentration présumé de Dpp dans les deux compartiments, active les gènes *spalt* et *omb* à deux seuils différents de concentration.

Dpp. *omb* et *spalt* sont les homologues, respectivement des gènes *Tbx* et *Sall* qui sont impliqués dans le développement des membres des vertébrés (Section 11.9). L'expression de *omb* et de *spalt* dans le disque alaire détermine la position des nervures de l'aile adulte. Brinker, dont la production est inhibée par Dpp, est un répresseur de l'expression de *spalt* et *omb*, et contribue à la régulation fine de l'expression de ces deux gènes.

Plusieurs types de résultats expérimentaux suggèrent que Dpp agit comme un morphogène dans le disque d'aile. Des clones de cellules incapables de répondre au signal Dpp n'expriment pas *spalt* ou *omb*. L'expression ectopique de *dpp* dans une région où *spalt* et *omb* ne sont normalement pas exprimés conduit à l'expression localisée de ces deux gènes dans les cellules qui entourent celles exprimant *dpp*. La formation du gradient de Dpp dans le disque d'aile est un processus complexe qui n'est que partiellement compris. Le glypicane Dally, présent à la surface des cellules, est impliqué dans la mise en place du gradient de Dpp et influence la signalisation Dpp *via* une action sur le récepteur de Dpp, Thick veins.

La disposition caractéristique des nervures de l'aile est un des résultats de l'activité des signalisations Dpp et Hedgehog dans le disque d'aile (Fig. 11.33). Ceci a été montré en exprimant de manière ectopique *hedgehog* dans des clones cellulaires génétiquement marqués. Quand de tels clones sont générés dans le compartiment postérieur, le développement de l'aile est plus ou moins normal car les cellules postérieures expriment de toute manière déjà *hedgehog*. Si des clones exprimant *hedgehog* sont générés dans le compartiment antérieur, en revanche, une duplication en miroir des structures de l'aile est observée (Fig. 11.33). L'expression ectopique de *hedgehog* a induit un nouveau site d'expression de *Dpp* dans le compartiment antérieur, ce qui conduit à la formation d'un nouveau gradient de Dpp.

Il n'existe pas un processus simple et unique par lequel Hedgehog et Dpp déterminent la position des nervures de l'aile. La position de chacune d'elles est en fait contrôlée par une combinaison unique de facteurs, notamment les niveaux des signalisations Dpp et Hedgehog, le compartiment dans lequel se trouvent les cellules et la présence ou l'absence de certains facteurs de transcription. La nervure latérale L5 dans le compartiment postérieur se développe à la frontière entre les domaines d'expression de *omb* et de *brinker*. Il semble donc que Dpp et Hedgehog n'agissent pas directement sur la formation des nervures, mais établissent une série d'interactions cellulaires qui spécifient l'information de position dans tout le disque, peut-être même au niveau de cellules individuelles. La précision et la reproductibilité de la disposition des nervures dans les ailes gauches et droites sont frappantes.







11.21 Un centre de signalisation situé à la frontière entre les compartiments dorsaux et ventraux organise le développement de l'aile de la drosophile selon l'axe dorso-ventral

Pendant le second stade larvaire, le disque alaire se subdivise en un compartiment dorsal et un compartiment ventral, à l'origine des surfaces dorsale et ventrale de l'aile adulte (Fig. 11.34). Les compartiments dorsaux et ventraux ont été initialement identifiés grâce à des expériences de lignage cellulaire et sont caractérisés par l'expression du gène sélecteur *apterous*, exprimé uniquement dans le compartiment dorsal et qui définit l'identité dorsale. Apterous présente des similitudes de séquences avec Lmx1b de la souris, qui spécifie une identité dorsale dans le mésoderme du bourgeon de membre (Section 11.10).

La frontière entre le compartiment dorsal et le compartiment ventral agit comme un centre organisateur. Les cellules de cette région produisent la molécule de signalisation Wingless (Fig. 11.34). *apterous* commence à être exprimé dans le compartiment dorsal peu après que l'ébauche de l'aile a été établie. À la frontière entre les compartiments dorsaux et ventraux, Apterous induit l'expression, dans les cellules dorsales, du gène *Serrate* qui code un ligand de Notch, et inhibe l'expression de *Delta*, codant un autre ligand de Notch, qui de ce fait n'est exprimé que par les cellules ventrales. La signalisation Notch (Encart 5D) à la frontière entre les compartiments induit l'expression de *Wingless* dans cette région. Wingless a son tour induit l'expression de *Delta* et *Serrate* à la frontière entre les compartiments et progressivement affine sa propre expression, ainsi que la signalisation Notch. Les signalisations Notch et Wingless concentrent l'expression de *vestigial* dans un large domaine centré sur la frontière dorso-ventrale (Fig. 11.34). Des analyses génétiques suggèrent que Wingless n'agirait pas comme un morphogène à long rayon d'action, mais pourrait collaborer avec d'autres protéines à effet local, notamment des facteurs de transcription comme Vestigial.

11.22 Le gène vestigial spécifie l'identité des ailes et contrôle leur croissance

Le gène *vestigial* a été initialement identifié par des analyses génétiques comme un gène qui contrôle la mise en place, la croissance et l'organisation de l'aile. Une perte de fonction totale de ce gène conduit à une absence totale des ailes (Fig. 1.12), et des pertes de fonction partielles, à des défauts dans leur développement. L'expression ectopique de *vestigial* dans d'autres disques imaginaux (d'œil, de patte ou génitaux) les transforme en disques aile.

L'expression de *vestigial*, qui code un co-activateur transcriptionnel, reflète les différentes étapes de la formation de l'aile en étant au cœur de contributions moléculaires variées, et son contrôle est assuré par plusieurs *enhancers* qui intègrent les informations moléculaires qui gouvernent la formation de l'aile. Fig. 11.34 Wingless est la protéine signal produite à la frontière des compartiments dorsal et ventral. Cette frontière est établie à la fin du second stade larvaire par la délimitation d'un compartiment dorsal due à l'expression du gène codant Apterous. Ce facteur de transcription induit une signalisation Notch, en induisant l'expression de Serrate dans les cellules dorsales, ce qui conduit à l'expression de Delta dans les cellules ventrales adjacentes, Delta et Serrate étant des ligands de Notch. L'activité de Serrate augmente l'expression de Delta et vice-versa. Delta et Serrate induisent l'expression de wingless dans une bande de cellules à la frontière dorso-ventrale. La combinaison de ces signaux augmente l'expression de vestigial, qui code un régulateur essentiel du développement de l'aile, dans une large bande centrée sur la frontière dorso-ventrale. La photographie montre les expressions de *wingless* (en vert) et de *vestigial* (en rouge) dans le disque d'aile d'une larve au troisième stade. Les deux gènes sont co-exprimés dans une bande de cellules qui apparaît en jaune à la frontière dorso-ventrale.

Photographie reproduite avec l'autorisation de Zecca, M., et al. : **Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient**. Cell 1996, **87** : 833-844. © 1996 Cell Press.

Fig. 11.35 *vestigial* intègre différents signaux *via* différents éléments

régulateurs. Le gène vestigial contient deux enhancers différents, appelés "boundary enhancer" (BE) et "quadrant enhancer" (QE), qui en répondant à des signalisations différentes, permettent une augmentation de la transcription du gène à différents moments et dans différentes parties du disque. Ces enhancers sont localisés dans des introns du gène. BE répond aux signalisations Notch et Wingless à la frontière dorso-ventrale et provoque une augmentation de l'expression de vestigial dans cette région. QE est activé plus tard, au début du troisième stade larvaire, en réponse à la signalisation Wingless, à la frontière dorso-ventrale, et à celle de Dpp, à la frontière antéro-postérieure, et contrôle l'expression de vestigial dans les quatre quadrants de l'aile. C'est cette expression qui contrôle la croissance et la suite du développement de l'aile.

Données d'après Kim, J., et al. : Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by Drosophila vestigial gene. Nature 1996, **382 :** 133-138.



Comme indiqué précédemment (Section 11.19), l'initiation du développement de l'aile dépend de l'expression de *vestigial* dans un petit groupe d'environ 30 cellules au centre du disque d'aile lors du premier stade larvaire. Cette expression est contrôlée par un *enhancer* (BE) qui répond aux signalisations Notch et Wingless dans le disque à ce stade. En liaison avec l'évolution du profil spatial d'expression de *wingless*, l'expression de *vestigial* se concentre dans les cellules situées à la frontière dorso-ventrale de l'ébauche de l'aile au début du second stade larvaire. Ces cellules formeront la marge de l'aile. Au début du troisième stade larvaire, la combinaison de signaux Wingless émanant de la frontière dorso-ventrale et Dpp émanant de la frontière antéro-postérieure, active l'expression de *vestigial* dans toute l'ébauche de l'aile *via* un autre *enhancer* (QE). La fonction de Vestigial dans la stimulation de la prolifération des cellules de l'aile et de sa croissance est liée à la combinaison de ces deux patrons d'expression (Fig. 11.35). Si un gène rapporteur *lacZ* est placé sous le contrôle de l'enhancer QE, son expression révèle précisément la croissance de l'aile dans le disque imaginal au cours des stades larvaires tardifs.

Vestigial est une protéine nucléaire qui intervient dans la régulation de l'expression génique. Elle n'a pas de domaine de liaison à l'ADN et sa capacité à réguler la transcription s'effectue grâce à son interaction avec Scalloped, un facteur de transcription très largement produit et également requis pour le développement des ailes. Bien que seul un petit nombre de cibles du complexe Vestigial-Scalloped soit connu, les effets des mutations de perte de fonction de ces gènes montrent que le complexe doit réguler une batterie importante de gènes déterminant que les cellules les exprimant forment des structures typiques de l'aile.

L'expression de *vestigial* sous le contrôle de l'*enhancer* QE dépend strictement de la présence de protéines Vestigial et donc de l'expression plus précoce du gène. C'est un exemple d'autorégulation qui maintient l'expression du gène au cours du temps et des divisions cellulaires (Section 8.3). L'*enhancer* QE intègre également des informations de position dorso-ventrales et antéro-postérieures, en étant capable de répondre aux signaux Dpp et Wingless. Il est probable qu'il existe des gènes exerçant une fonction similaire à celle de *vestigial* dans d'autres disques chez la drosophile, c'est-à-dire des gènes qui intègrent l'activité de molécules de signalisation et de facteurs de transcription produits dans tous les disques et font en sorte que les cellules produisent les structures caractéristiques du disque spécifique dans lequel ils sont exprimés. Cette fonction n'est pas forcément exercée par un gène unique, mais peut l'être par une combinaison de gènes. Ainsi, il n'existe pas chez la drosophile un gène unique spécifique de la patte comme l'est *vestigial* pour l'aile.

Les mécanismes décrits dans les sections précédentes conduisent à la subdivision du disque d'aile en une série de domaines chevauchants d'expression génique. Bien que la façon avec laquelle ils agissent soit totalement inconnue, ces domaines d'expression contrôlent la mise en place des structures de l'aile, par exemple les
nervures, mais aussi la taille des différentes parties de l'aile. La croissance de l'aile dépend dans une certaine mesure des signalisations Wingless et Dpp. Les profils de prolifération et de croissance de l'aile ne peuvent néanmoins pas être reliés clairement aux gradients de ces molécules de signalisation, ni même aux patrons d'expression de leurs gènes cibles. Le disque d'aile croît en taille grâce à des divisions cellulaires qui se déroulent dans le disque puis s'arrêtent globalement toutes avant la métamorphose quand le disque a atteint sa taille correcte. La formation de l'aile pendant la métamorphose se fait sans divisions cellulaires, par des changements de forme des cellules.

Il est maintenant clair qu'en plus des informations biochimiques qu'elles reçoivent et qui stimulent ou inhibent leur prolifération, les cellules sont aussi influencées par des forces physiques et des signaux mécaniques associés à la densité de cellules et aux contraintes géométriques du tissu. Le disque d'aile circulaire, par exemple, est délimité par des sillons profonds qui génèrent des profils particuliers de forces physiques (tensions et stress) qui, en affectant aussi les taux de croissance, et les directions de croissance tissulaire, peuvent modifier la forme du tissu (Chapitre 9).

Des analyses génétiques ont identifié la voie de signalisation Hippo (Encart 13A) comme un élément important permettant de relier les changements de forme, d'adhérence et de densité des cellules à la croissance cellulaire. Wingless et Dpp peuvent interagir avec la voie Hippo et ces interactions pourraient être une des manières dont ces voies peuvent influencer la croissance de l'aile. Scalloped, le facteur de transcription qui interagit avec Vestigial, est l'homologue du facteur de transcription TEAD dont l'activité est contrôlée par la voie Hippo. L'interaction entre Scalopped et Vestigial fournit une base intéressante pour penser comment la signalisation Hippo pourrait intégrer la mise en place de l'organisation de l'aile et sa croissance.

11.23 Comment l'organisation de l'aile le long de l'axe proximo-distal est-elle établie reste une question ouverte

L'aile adulte, comme tous les autres appendices, possède un axe proximo-distal qui est moins facile à visualiser dans le disque aplati imaginal que les axes dorso-ventral et antéro-postérieur. Comme cela est illustré dans la Fig. 11.27, la future région tissulaire de l'aile peut être considérée comme la partie la plus distale du disque alaire. Cette région est entourée par les cellules qui forment les structures articulaires par lesquelles l'aile est reliée au reste du corps, ou celles du tergite qui constitue la partie la plus proximale du disque. Comment l'axe proximo-distal de l'aile de la drosophile est-il mis en place reste mystérieux, mais il semble que des effets à courte et à longue distance de Wingless sur l'expression de certains gènes, soient impliqués. Plus tard dans ce chapitre, il sera montré que les patrons de taches colorées sur les ailes des papillons sont une manifestation de l'organisation proximo-distale de celles-ci.

En plus de l'asymétrie générale de l'organisation alaire due à l'agencement des structures selon différents axes, les cellules épidermiques de l'aile deviennent ellesmêmes polarisées dans une direction proximo-distale comme le montre la disposition des « poils » (trichomes) sur la surface de l'aile. Chacune des environ 30 000 cellules de l'épiderme de l'aile produit un seul trichome qui pointe distalement (Fig. 11.28 qui montre uniquement les trichomes visibles sur les bords de l'aile). C'est un exemple de polarité planaire et ce qui est connu à propos des mécanismes impliqués est décrit dans l'Encart 2I.

11.24 Le développement du disque de patte se fait de manière similaire à celui du disque d'aile, sauf en ce qui concerne l'axe proximo-distal

Les pattes des insectes sont fondamentalement des tubes épidermiques articulés et ont donc une structure totalement différente de celle des membres de vertébrés. Les cellules épidermiques sécrètent une cuticule externe rigide qui forme l'exosquelette de la patte. À l'intérieur sont présents des muscles, des nerfs et du tissu conjonctif. Une modification de la forme des cellules épithéliales du disque imaginal est responsable de la croissance de la patte pendant la métamorphose. Tout se passe comme Fig. 11.36 Formation de la patte par extension de son disque au moment de la métamorphose. L'épithélium du disque, qui est une extension de l'épithélium de la paroi du corps, est initialement replié à l'intérieur du corps. À la métamorphose, il s'étend vers l'extérieur, comme poussé par son centre. La flèche rouge (à gauche) est l'endroit où s'observent les cercles concentriques montrés dans la Fig. 11.37.





si le centre du disque était tiré vers l'extérieur avec pour résultat la formation de l'extrémité distale de la patte (Fig. 11.36).

La façon la plus simple de relier le disque de patte à la patte adulte est de le considérer comme un cône aplati. Le disque peut être considéré comme constitué de cercles concentriques, chacun produisant un segment de la patte le long de l'axe proximo-distal (Fig. 11.37). Le cercle le plus externe produit la partie la plus proximale de la patte qui est attachée au corps et les cercles les plus centraux du disque les parties les plus distales de la patte.

Le disque contient au moment de sa formation environ 30 cellules et croît jusqu'à en contenir plus de 10 000 lors du troisième stade larvaire. Contrairement au disque d'aile, dès sa formation, le disque de patte contient des cellules spécifiées comme cellules de patte. Les premières étapes de la mise en place de l'organisation antéro-postérieure du disque de patte sont les mêmes que dans l'aile. Le gène *engrailed* est exprimé uniquement dans les cellules du compartiment postérieur et son expression induit celle de *hedgehog*. La protéine Hedgehog induit la formation d'un centre organisateur à la frontière antéro-postérieure. Dans la partie dorsale du disque, l'expression de *dpp* dans le compartiment antérieur est induite comme dans l'aile. Dans la partie ventrale, en revanche, Hedgehog induit l'expression de *wingless* à la place de *dpp* dans les cellules antérieures près de la frontière et, comme dans l'aile, Wingless coordonne des signalisations à courte distance associées à la croissance de la patte (Fig. 11.38).

La mise en place de l'axe proximo-distal est nettement mieux comprise dans le cas de la patte que de l'aile. Elle implique des interactions entre Wingless et Dpp, similaires à celles survenant dans l'aile, mais avec des gènes cibles différents. L'extrémité distale de la patte correspond à la zone de rencontre des domaines d'expression de *wingless* et *dpp*, et est marquée par l'expression de *Distal-less* qui code un facteur de transcription à homéodomaine. Ce gène est aussi exprimé dans l'aile mais ne semble y jouer aucun rôle car, en absence de fonction de ce gène, les ailes se développent normalement. *Distal-less* est en revanche crucial pour le développement correct des pattes.

La mise en place de l'organisation proximo-distale se fait séquentiellement et produit d'abord une organisation bidimensionnelle dans le disque qui est convertie pendant la métamorphose en l'organisation tridimensionnelle de la patte. L'expression

Fig. 11.37 Carte des territoires présomptifs du disque de patte de la drosophile. Le disque est une couche de cellules épithéliales de forme grossièrement circulaire, qui est transformée en une patte tubulaire à la métamorphose. La partie centrale du disque devient la partie distale de la patte et les parties périphériques du disque produisent les parties proximales de la patte. Le tarse est subdivisé en cinq segments. Les régions présomptives de la patte adulte, par exemple le tibia, sont donc arrangées sous forme d'une série de cercles avec l'extrémité distale au centre. Une frontière divise le disque en compartiments postérieurs et antérieurs. Il n'y a pas de compartimentation dorso-ventrale dans le disque de patte comme cela s'observe pour celui de l'aile.

Illustration d'après Bryant, P.J. : The polar coordinate model goes molecular. Science 1993, **259 :** 471-472.



précoce de *Distal-less* est contrôlée par un élément régulateur spécifique qui n'est actif que pendant quelques heures. L'expression plus tardive du gène dans la future partie distale du disque dépend d'autres éléments régulateurs. *homothorax*, un gène qui code un autre facteur de transcription à homéodomaine, est exprimé dans la région externe à celle de *Distal-less*, qui forme la future région proximale de la patte (Fig. 11.39). L'activité des deux gènes conduit à l'expression de *dachsund*, qui code également un facteur de transcription, dans un anneau de cellules situé entre les domaines d'expression de *Distal-less* et d'*homothorax* et chevauchant ces domaines. Chacun de ces gènes est requis pour la formation d'une partie précise de la patte, mais les domaines d'expression ne correspondent pas exactement avec les segments de la patte. Ainsi, *dachsund* est exprimé dans les cellules qui produisent le fémur, le tibia et le tarse proximal. Il ne semble pas y avoir de frontière entre compartiments proximal et distal, mais les cellules exprimant *homothorax* et *Distal-less* ne se mélangent pas à l'interface entre les deux domaines d'expression.

La formation de la patte nécessite également un gradient disto-proximal d'activité des récepteurs à EGF. Dans la larve de troisième stade, le ligand de EGF, Vein, et Rhomboïd, un élément de la voie de signalisation EGF, sont produits dans la partie centrale du disque. Les gènes, codant les facteurs de transcription Bric-à-brac et Bar, sont exprimés à différents niveaux dans les segments tarsaux et pourraient contrôler leur identité. Les taux d'expression de ces gènes pourraient être contrôlés par le gradient d'activité des récepteurs EGF. La formation des articulations de la patte nécessite la signalisation Notch. Delta et Serrate, ligands de Notch, sont exprimés dans les cellules de chaque segment de la patte et leur activation de Notch conduit à la spécification des cellules formant l'articulation.

11.25 Les motifs colorés des papillons se forment grâce à des informations positionnelles supplémentaires

Il existe une variété remarquable de motifs colorés sur les ailes des environ 17 000 espèces de papillons. Une grande partie des patrons de coloration observés sont des

Fig. 11.39 Subdivision de la patte de drosophile en régions le long de l'axe proximodistal. Les profils d'expression génique dans la patte sont montrés à droite. Des stades d'expression génique sont montrés dans les deux colonnes de gauche. En raison de la façon avec laquelle la patte se développe à partir du disque, le centre du disque correspond à la future partie distale de la patte et les parties plus proximales à des anneaux concentriques qui l'entoure. *decapentaplegic (dpp)* et *wingless (wg)* sont initialement exprimés le long de la frontière antéro-postérieure. Ensemble, ils activent l'expression de *Distal-less (DII)* dans le centre du disque et répriment celle de *homothorax (hth)* qui est exprimé dans la partie périphérique du disque. Ils activent ensuite *dachshund (dac)* dans un cercle de cellules entre celles qui expriment *DII* et *hth.* D'autres signalisations conduisent ces domaines à devenir chevauchants. Bien que le domaine d'expression d'*hth* corresponde aux régions proximales de la patte et celui de *DII* aux régions distales, il n'y a pas de correspondance simple entre les domaines d'expression des autres gènes et les segments de la patte.

D'après Milan, M., Cohen, S. M.: Subdividing cell populations in the developing limbs of Drosophila : Do wing veins and leg segments define units of growth control ? Dev. Biol. 2000, 217 : 1-9.

Fig. 11.38 Établissement de centres de signalisation à la frontière des compartiments antérieur et postérieur dans le disque de patte et spécification de la partie distale. Le gène engrailed est exprimé dans le compartiment postérieur et induit l'expression de hedgehog. Les cellules antérieures qui reçoivent le signal activent l'expression de *decapentaplegic* dans la région dorsale et celle de *wingless* dans la région ventrale. Ces deux gènes codent des protéines sécrétées de signalisation. L'expression de Distal-less, qui spécifie l'axe proximo-distal du disque, est activée dans les cellules qui reçoivent les deux signaux Wingless et Decapentaplegic.





Fig. 11.40 Les motifs colorés de l'aile des papillons. Vue ventrale d'une femelle de l'espèce africaine *Bicyclus anynana*, montrant le patron des colorations alaires et des ocelles importants.

Photographie aimablement communiquée par V. French and P. Brakefield.



Fig. 11.41 Micrographie d'une drosophile portant une mutation Antennapedia observée au microscope électronique à balayage. Ces drosophiles ont des antennes transformées en pattes (flèches). Barre d'échelle = 0,1 mm.

Photographie de D. Scharfe, from Science Photo Library. variations d'une organisation de base comprenant des bandes et des ocelles colorés (Fig. 11.40). Les ailes sont recouvertes d'écailles cuticulaires chevauchantes qui sont colorées par des pigments synthétisés et déposés par les cellules épidermiques sousjacentes. Comment ces patrons colorés sont-ils mis en place ? Les ailes des papillons se développent à partir de disques imaginaux présents dans la chenille. Des manipulations chirurgicales ont montré que les ocelles sont spécifiés à un stade tardif du développement du disque alaire et que leur disposition dépend d'un signal émanant du centre de l'ocelle. Plusieurs gènes qui contrôlent le développement de l'aile chez la drosophile, comme *apterous*, ont des profils d'expression spatio-temporels chez le papillon similaires à ceux chez la drosophile. Comme chez la drosophile, la forme et la structure des ailes de papillons est contrôlée par des informations de position, mais des informations additionnelles seront établies pour contrôler les patrons de pigmentation.

Contrairement aux ailes de drosophile, le développement des ailes des papillons nécessite la fonction de *Distal-less* qui intervient dans la mise en place des motifs colorés. Le profil d'expression de *Distal-less* dans les disques d'aile de papillon suggère que le mécanisme qui contrôle la mise en place des motifs colorés est similaire à celui qui spécifie les informations de position le long de l'axe proximo-distal de la patte de la drosophile. Dans l'aile de papillon, *Distal-less* est exprimé au centre des ocelles, alors que chez la drosophile il est exprimé au centre du disque de patte. Il est donc possible que la formation des ocelles et la mise en place des structures distales de la patte se basent sur des mécanismes similaires, bien que dans l'aile du papillon l'expression de *Notch* précède celle de *Distal-less*.

L'ocelle peut être donc vu comme une structure ayant une organisation proximo-distale se surimposant sur la surface de l'aile qui est bidimensionnelle. Le centre de l'ocelle représente les valeurs de position les plus distales et les cercles concentriques représentent des positions de plus en plus proximales. Les positions des ocelles sont définies par rapport à l'organisation antéro-postérieure et dorso-ventrale de l'aile ; un second système de coordonnées est alors mis en place, centré sur l'ocelle, avec l'expression de *Distal-less* définissant le centre de celui-ci.

11.26 Différents disques imaginaux peuvent avoir les mêmes valeurs de position

Le développement des pattes et des ailes implique des signaux similaires, comme Dpp et Wingless, mais la structure finale qui se forme est très différente. Cela implique que les cellules des disques d'aile et de patte interprètent les signaux de position de manière différente. Cette interprétation dépend de deux types de contrôle, les deux impliquant des facteurs de transcription. Le premier est centré sur la protéine Vestigial qui n'est produite que dans l'aile. Comme évoqué précédemment (Fig. 11.29), Vestigial permet la formation de structures spécifiques en réponse aux informations de position provenant des centres de signalisation situés aux frontières des compartiments. En effet, une production ectopique de Vestigial à des endroits où les signaux Wingless, Dpp et Notch convergent, provoque le développement de tissus d'aile.

Le second type de contrôle est lié aux segments dont dérivent les appendices. Il permet de comprendre pourquoi des ailes ne se forment que dans un seul segment thoracique chez la drosophile, les pattes dans les trois segments thoraciques et les antennes que dans la tête. Ce contrôle dépend des gènes Hox et peut être illustré avec la formation des pattes et des antennes. Si le gène Hox *Antennapedia*, normalement exprimé dans les parasegments 4 et 5 (Section 2.31) et qui spécifie les disques de la seconde paire de pattes, est exprimé dans la tête, les antennes se développent comme des pattes (Fig. 11.41).

L'expression d'*Antennapedia* dans la région de la tête, où il n'est normalement pas exprimé, transforme le disque d'antenne en un disque de patte et conduit à la formation d'une patte ectopique de second segment thoracique (T2). En utilisant la technique de recombinaison mitotique (Encart 2H), il est possible de générer un clone de cellules exprimant *Antennapedia* dans un disque d'antenne par ailleurs normal. Ces cellules se développent comme des cellules de pattes, mais le type de cellules de patte dépend de leur position le long de l'axe proximo-distal du disque. Si elles sont à l'extrémité distale, elles forment une griffe. Il semble donc que les valeurs de position des cellules de l'antenne et de la patte soient les mêmes et la différence entre les deux structures provient de l'interprétation de ces valeurs, qui est gouvernée par l'expression ou la non-expression d'*Antennapedia* (Fig. 11.42). Les cellules se développent en fonction de leur position et de leur histoire au cours du développement, qui déterminent quels sont les gènes exprimés à tous les instants. *Antennapedia* est normalement exprimé dans les segments T2 et T3, permettant le développement de pattes dans ces segments, alors que la formation de patte dans T1 est due à l'expression du gène Hox *Sex combs reduced*.

Ce principe s'applique également aux disques d'aile et d'haltère qui se développent dans deux segments adjacents (T2 et T3). La différence dépend du gène Hox *Ultrabithorax* qui est exprimé dans T3 qui forme des haltères et pas dans T2 qui produit des ailes.

Il y a donc une similitude dans la stratégie du développement utilisée chez les insectes et les vertébrés : dans les deux cas, une même information de position est interprétée différemment dans différents appendices comme les ailes et les pattes. Il reste à comprendre comment un seul facteur de transcription comme Antennapedia peut transformer une antenne en patte. Cela requiert l'identification de ses cibles et la compréhension de leurs fonctions. Antennapedia agit comme un répresseur de l'identité antennaire dans le disque de patte, notamment en empêchant la co-expression de *homothorax* et *Distal-less* dans la région du fémur. Ces deux gènes sont co-exprimés dans la région correspondante du disque d'antenne, mais dans le disque de patte ils sont exprimés dans des domaines adjacents non chevauchants (Fig. 11.39). En terme évolutif, cela suggère que l'antenne pourrait être l'état par défaut du développement des appendices.

L'identité d'un disque et la façon dont l'information de position est interprétée, sont donc fortement influencées par l'expression ou l'absence (dans le cas du disque d'antenne) d'expression des gènes Hox. Ceci peut être illustré par la distribution des pattes et des ailes chez la drosophile. Les pattes ne se forment que dans les segments thoraciques chez les insectes et, chez la drosophile, des ailes ne sont présentes que dans le segment T2. Ceci est dû à ce que les disques imaginaux spécifiques qui produisent ces appendices ne peuvent se former que dans certains parasegments (Fig. 11.43). Il n'y a pas d'appendices dans les segments abdominaux chez la drosophile car les gènes requis pour la formation des pattes et des ailes ne sont pas exprimés dans l'abdomen. Le type de disques qui se forme dans un segment thoracique donné est spécifié par l'action d'un des gènes Hox exprimé dans le segment. Par exemple, l'expression des gènes *Antennapedia* et *Ultrabithorax* spécifie respectivement la seconde et la troisième paire de pattes.

Les disques imaginaux de patte se développent à partir de petits amas de cellules ectodermiques des parasegments 3 à 6 qui contribuent à la formation des segments thoraciques de l'embryon (Fig. 11.43). Les disques se forment à la frontière entre les parasegments, avec les compartiments antérieurs et postérieurs des parasegments adjacents contribuant à chaque disque. Dans le futur segment T2, le disque de patte se subdivise au tout début de son développement et produit un second disque qui deviendra le disque d'aile. Le même processus se passe dans le segment T3 dans lequel le second disque formé devient le disque d'haltère.

Comme les disques se forment à cheval sur deux parasegments, des mutations des gènes Hox peuvent provoquer des transformations homéotiques qui ne concernent qu'un des deux compartiments de l'appendice. Chez des drosophiles adultes normales, l'aile est au niveau du segment T2 et l'haltère à celui du segment T3. Ils proviennent de disques imaginaux qui se forment, respectivement, à la frontière entre les parasegments 4/5 et 5/6 (Fig. 11.43). Dans l'embryon normal, *Ultrabithorax*, l'un des gènes du complexe bithorax (Fig. 2.49), est exprimé dans les parasegments 5 et 6 et spécifient leurs identités. La mutation *bithorax (bx)*, une mutation de perte de fonction partielle d'*Ultrabithorax*, cause la transformation du compartiment antérieur de T3, et donc celui de l'haltère, en compartiment correspondant antérieur de T2, la



Fig. 11.42 Les cellules interprètent leur position en fonction de leur histoire et de leur génotype. Si deux drapeaux utilisent la même information de position pour produire des patrons différents, alors la greffe de l'un sur l'autre conduira à ce que le greffon se développe en fonction de sa nouvelle position, mais en gardant son patron d'origine (en haut). Les disques imaginaux utilisent la même information de position pour produire des appendices avec des organisations différentes (en bas).



Fig. 11.43 Position dans l'embryon âgé de drosophile des disques imaginaux produisant les appendices thoraciques. Les disques des pattes, ailes et haltères chevauchent la frontière parasegmentaire, comme c'est montré pour les disques des segments T2 et T3 dans le schéma du bas.

partie antérieure de l'haltère devenant une aile (Fig. 2.50). Une autre mutation *postbithorax* (*pbx*), qui affecte la région régulatrice d'*Ultrabithorax*, provoque la transformation du compartiment postérieur de l'haltère en aile (Fig. 11.44). Si une mouche est homozygote pour les deux mutations, les effets sont additifs et la mouche possède quatre ailes et pas d'haltère (Fig. 2.50). Une autre mutation *Haltere mimic*, cause une transformation homéotique opposée : l'aile est transformée en haltère.

Un exemple encore plus frappant de transformation homéotique peut être observé quand la totalité du complexe bithorax, responsable de l'identité de tous les segments postérieurs à T2, est éliminée. Les embryons homozygotes pour cette délétion meurent pendant le développement embryonnaire et tous leurs segments abdominaux se développent en segments T2 (Fig. 2.51). Dans chacun d'eux, il est possible de détecter un disque de patte et un disque d'aile qui ne se développent pas complètement, l'embryon ne pouvant éclore.

Comme dans le cas de l'antenne et de la patte, il est possible de générer un haltère mosaïque contenant des petits clones de cellules homozygotes pour une mutation de *Ultrabithorax* (par exemple *bithorax*) : les cellules de ces clones produisent des structures d'aile qui correspondent exactement à celles qui auraient été formées dans la même position dans l'aile. Les valeurs de position dans les disques d'aile et d'haltère sont identiques, et ce qui a été altéré dans les clones mutants, c'est comment ces valeurs sont interprétées. En fait, les autres disques imaginaux semblent avoir des informations de position similaires.



Fig. 11.44 Effets des mutations dans le complexe bithorax sur l'identité des disques imaginaux. La mutation *postbithorax* conduit à la transformation du compartiment postérieur de l'haltère en compartiment postérieur d'aile. La délétion de tous les gènes du complexe bithorax conduit à la présence de disques d'aile et de patte dans tous les segments des embryons homozygotes pour cette délétion (non montré).

RÉSUMÉ

Les pattes et les ailes se développent à partir de structures épithéliales, les disques imaginaux, mises à l'écart dans l'embryon. L'expression des gènes Hox dans les parasegments spécifie quel type d'appendices sera formé. Les disques d'aile et de patte sont subdivisés dès leur formation en compartiments antérieurs et postérieurs. Les frontières entre compartiments sont des sources de signalisation qui organisent le développement des disques. Dans le disque d'aile, l'expression de decapentaplegic est activée par la protéine Hedgehog à la frontière antéro-postérieure et Decapentaplegic ainsi que Hedgehog agissent comme des morphogènes contrôlant l'organisation antéro-postérieure du disque. Un autre signal important pour le développement du disque d'aile est la protéine Wingless qui est produite à la frontière entre compartiments dorsal et ventral du disque. Un gène essentiel pour le développement de l'aile est vestigial qui intègre les informations de position via ses éléments régulateurs et contrôle l'expression de gènes qui promeuvent la formation des structures de l'aile et sa croissance. Dans le disque de patte, la frontière antéro-postérieure est établie de manière très similaire, si ce n'est que Hedgehog active l'expression de wingless au lieu de celle de decapentaplegic dans la région ventrale du disque. Il ne semble pas y avoir de compartiments dorsal et ventral dans le disque de patte. La formation de l'axe proximo-distal est contrôlée par des interactions entre Decapentaplegic et Wingless, qui activent l'expression de gènes comme dachshund et homothorax dans des domaines concentriques correspondant aux différentes régions de la patte. La formation des ocelles colorés des ailes de papillons pourrait être contrôlée par des mécanismes similaires à ceux intervenant dans l'organisation de l'axe proximo-distal de la patte.



Les yeux des vertébrés et des insectes

Les yeux des insectes et l'œil « camera » des vertébrés sont des structures complexes, aboutissement remarquable de l'évolution (Fig. 11.45). Ces yeux partagent certaines similitudes. Ils contiennent chacun une lentille focalisant la lumière, une rétine composée de photorécepteurs sensibles à la lumière, et une couche pigmentaire absorbant les rayons lumineux et empêchant les interférences avec la signalisation des photorécepteurs. Malgré les grandes différences anatomiques entre les yeux d'insectes et de vertébrés, certains facteurs de transcription communs contrôlent leur formation. La description débutera avec le développement de l'œil des vertébrés, une expansion du cerveau antérieur, le prosencéphale. Dans l'œil de vertébrés, la lumière pénètre par la pupille à la face antérieure de l'œil et traverse une lentille transparente, qui fait converger les rayons lumineux sur la rétine tapissant le fond de l'œil (Fig. 11.45). Les cellules photoréceptrices de la rétine, les cônes et les bâtonnets, captent les photons et envoient des signaux aux cellules nerveuses qui, *via* le nerf optique, les transmettent au cerveau où ils sont décodés.

Une caractéristique de l'œil de vertébrés reste depuis longtemps énigmatique : les photorécepteurs occupent la couche la plus profonde de la rétine, et non celle en





Concerns and the statistic statistic

contact avec l'humeur vitrée, où ils pourraient recevoir une lumière plus intense et non diffractée et dispersée par la traversée des cellules sus-jacentes, ce qui permettrait une image plus précise (Fig. 11.45). Une réponse possible à cette énigme serait de démontrer que la glie radiaire, c'est-à-dire les cellules de Müller qui traversent toute l'épaisseur de la rétine, agit comme des fibres optiques guidant la lumière et transmettant l'image de façon efficace, pixel par pixel, jusqu'aux photorécepteurs.

11.27 L'œil des vertébrés se développe essentiellement à partir du tube neural et de l'ectoderme de la tête

En terme de développement, l'œil de vertébrés est essentiellement une extension du prosencéphale avec une contribution de l'ectoderme sus-jacent et du mésenchyme environnant principalement dérivé de cellules des crêtes neurales. Le développement de l'œil débute à E8,5 chez la souris et vers le 22^e jour chez l'embryon humain, avec la formation d'une saillie, ou **évagination**, dans la paroi épithéliale du prosencéphale postérieur correspondant au diencéphale. Cette évagination est nommée **vésicule optique** ; une vésicule optique se forme de chaque côté du cerveau et progresse vers l'ectoderme superficiel (Fig. 11.46). La vésicule optique en interagissant avec l'ectoderme, induit la formation de la **placode** du cristallin, qui est un épaississement de l'ectoderme à partir duquel se formera le cristallin. Cette placode fait partie d'une région de l'ectoderme céphalique plus vaste où se différencient des placodes épithéliales d'autres organes sensoriels, incluant celle à l'origine des canaux semi-circulaires, la cochlée et les canaux endolymphatiques de l'oreille, et celle donnant naissance à l'épithélium olfactif du nez.



Fig. 11.46 Les principales étapes du développement de l'œil de vertébré. Les schémas du développement de la cupule optique et du cristallin montrent que la vésicule optique (en bleu) se développe comme une excroissance du cerveau antérieur et induit la placode du cristallin au niveau de l'épiderme céphalique (en jaune). La vésicule optique en s'invaginant forme une cupule bistratifiée, la cupule optique, qui entoure l'ébauche du cristallin constituée par la vésicule cristallinienne. La couche interne de la cupule optique forme la rétine neurale (en bleu pâle) et la couche externe, l'épithélium pigmenté (en bleu foncé). La vésicule cristallinienne se détache de l'épiderme pour former le cristallin et l'épiderme qui le recouvre est à l'origine de la cornée. L'iris (non montré) se développe à partir du bord de la cupule optique et l'espace rempli de liquide entre l'iris et la cornée

est la chambre antérieure de l'œil. Les photographies de microscopie électronique à balayage de sections frontales de la tête d'un embryon de souris montrent (a) la formation de la vésicule optique à E9-9,5 ; (b) la formation de la vésicule cristallinienne et de la cupule optique à E10,5 ; et (c) une vue à fort grossissement de la cupule optique et de la vésicule cristallinienne de (b).

Schéma d'après Adler, R., Valeria Canto-Soler, M. : **Molecular mechanisms of optic vesicle development : Complexities, ambiguities, and controversies.** Dev. Biol., 2007, **305 :** 1-13. Électronographie de Heavner, W., Pevny, L. : **Eye development and retinogenesis.** Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012, **4 :** a008391.

Après l'induction de la placode cristallinienne, la partie de la vésicule optique adjacente à la placode s'invagine pour former une cupule optique à deux feuillets. L'épithélium du feuillet interne de la cupule donnera la rétine nerveuse alors que celui du feuillet externe donnera l'épithélium pigmentaire. L'invagination de la placode cristallinienne est synchrone de l'invagination de la vésicule optique. La placode se détache alors de l'ectoderme superficiel pour former une petite sphère épithéliale creuse, la vésicule cristallinienne, qui générera le cristallin, alors que le reste de l'ectoderme superficiel donnera la cornée.

Le cristallin se forme par la prolifération des cellules épithéliales à la face antérieure de la vésicule cristallinienne, c'est-à-dire la face la plus proche de la cornée, les nouvelles cellules migrant vers le centre de la lentille où elles commencent à produire la protéine Cristalline. Les cellules perdent alors leurs noyaux, mitochondries et endomembranes et deviennent des fibres complètement transparentes remplies de Cristalline. Le renouvellement des fibres cristalliniennes continue après la naissance, mais à une vitesse beaucoup plus lente que chez l'embryon. Chez le poulet adulte la transformation des cellules épithéliales en fibres remplies de Cristalline s'effectue sur deux ans.

La cornée est un épithélium transparent qui scelle l'œil à l'avant. Elle est constituée de deux feuillets, un interne et un externe, d'origines distinctes. Le feuillet interne est formé de cellules mésenchymateuses dérivées de cellules des crêtes neurales ayant migré dans la chambre antérieure de l'œil pour former une couche



Fig. 11.47 Formation d'une cupule optique in vitro. À gauche : des agrégats de cellules ES de souris, cultivés en suspension dans un milieu sans sérum et contenant des constituants matriciels dont la laminine, s'organisent en sphères. L'épithélium rétinien s'évagine en une protusion hémisphérique formant une structure du type vésicule optique. Celle-ci en s'invaginant dans sa partie distale forme une cupule optique. La microphotographie montre une section de la rétine neurale stratifiée de la cupule optique auto-organisée qui révèle divers types cellulaires reconnaissables. PR, photorécepteurs ; CB, cellules bipolaires, CG + CA, cellules ganglionnaires + cellules amacrines. À droite : jonction (en bleu) de la région épithéliale à l'origine de la couche rétinienne pigmentée (rose et rouge) et de la rétine nerveuse (en vert). La constriction apicale des cellules au niveau de cette région intermédiaire initie l'invagination.

Microphotographie de Eiraku, et al. : **Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture.** Nature 2011, **472** : 51-56.

mince recouvrant au début le cristallin. Le feuillet externe de la cornée dérive de l'ectoderme superficiel adjacent. La majeure partie de l'iris se développe à partir de la bordure de la cupule optique, la marge ciliaire, les crêtes neurales contribuant à l'iris antérieur ainsi qu'à diverses structures de la partie antérieure de l'œil. Des cellules souches potentielles ont été identifiées dans la marge ciliaire de l'œil adulte, mais il n'est pas certain qu'elles s'auto-renouvellent et donnent naissance à tous les types cellulaires de l'œil.

La rétine neurale des vertébrés comporte trois couches cellulaires, avec les photorécepteurs formant la couche la plus interne, sous les couches des cellules bipolaires et ganglionnaires (Fig. 11.45). Cette disposition est inversée dans l'œil de pieuvre et du calmar, les photorécepteurs étant à la surface de la rétine neurale. Les signaux visuels sont transmis de l'œil au cerveau *via* le nerf optique formé par les axones des cellules ganglionnaires de la rétine neurale. La manière dont les neurones du nerf optique se connectent, dans le cerveau, avec les centres de traitement visuel de façon précise pour y établir une carte de la rétine, sera abordée Chapitre 12.

La morphogenèse de la cupule optique implique la croissance et le repliement des feuillets de cellules épithéliales. Bien que la vésicule optique et la placode cristallinienne soient étroitement apposées quand l'invagination commence, la vésicule optique peut s'invaginer en l'absence de la placode. Ceci a été la conclusion d'une étude menée dans les années 1930 sur le développement de l'œil d'embryons d'amphibien. Quand une vésicule optique est greffée dans le tronc, elle peut se développer en une cupule, bien que l'ectoderme du tronc soit incapable de former un cristallin. La capacité d'auto-organisation de la vésicule optique a été révélée récemment de façon encore plus spectaculaire dans des agrégats de cellules ES murines induites à se différencier in vitro en cellules épithéliales de rétine en présence de constituants de lame basale (Fig. 11.47). Après environ 8 jours de culture, les agrégats de cellules ES forment des sphères épithéliales creuses, et des saillies hémisphériques d'épithélium commencent à s'évaginer des sphères originelles, mimant ainsi l'évagination des vésicules optiques à partir du diencéphale lors du développement initial de l'œil chez l'embryon. Encore plus étonnant, deux jours après, les saillies hémisphériques subissent des modifications morphologiques donnant naissance à des structures à deux feuillets en forme de cupule, mimant l'invagination des vésicules optiques à l'origine des cupules optiques chez l'embryon. Les gènes caractéristiques des rétines neurale et pigmentaire s'expriment, respectivement, dans les cellules des feuillets interne et externe. Les cellules du feuillet interne donnent par la suite les principaux types neuronaux de la rétine, dont les photorécepteurs,

arrangés selon les couches appropriées, alors que les cellules du feuillet externe donnent des cellules pigmentaires.

Tout le processus de formation de la cupule optique peut être suivi en détail par imagerie 3D sur modèle vivant à partir d'agrégats cellulaires dans lesquels les cellules du 'champ oculaire' (région au centre de la plaque neurale antérieure à partir de laquelle se forment les yeux) et plus tard la rétine neurale expriment un gène rapporteur GFP. Les films ont révélé, par exemple, que la courbure de l'épithélium est associée à des changements de la forme des cellules épithéliales. Aux endroits où l'épithélium se replie en angle aigu, des points charnières sont constitués de cellules en forme de coin semblables à celles observées lors de la neurulation (voir Section 9.14). Une auto-formation de la cupule à deux feuillets et le développement d'une rétine neurale stratifiée apparaît de façon similaire à partir d'agrégats de cellules ES humaines. La capacité des cellules ES humaines à former dans des conditions appropriées des structures 3D est prometteuse dans le contexte de l'ingénierie tissulaire pour la médecine régénérative (Encart 8C). Pouvant être congelées et stockées, les cupules à deux feuillets constituent un matériel utile à l'étude des maladies dégénératives de l'œil humain.

Bien que l'évagination des vésicules optiques n'apparaisse qu'à la fermeture quasi achevée du tube neural, la spécification des futures cellules des yeux se fait bien plus tôt dans la plaque neurale. Les gènes codant les facteurs de transcription conservés, majeurs pour la spécification de l'œil tels que Pax6, Six3 et Otx2, sont exprimés dans la région neurale antérieure de gastrulas âgées qui s'individualise au début de la régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale. Ils continuent à être exprimés dans l'épithélium de la vésicule optique et de la placode cristallinienne, ainsi que dans d'autres précurseurs des organes sensoriels comme la placode olfactive. Les cellules précurseurs de la rétine sont à l'origine spécifiées dans un champ oculaire unique au centre de la plaque neurale antérieure. Le champ oculaire se divise ensuite en deux régions cellulaires latérales qui donneront, après la formation du tube neural, les vésicules optiques. La séparation est réalisée par la baisse de la synthèse de Pax6 et d'autres facteurs de transcription de la spécification de l'œil le long de la ligne médiane. L'échec de cette séparation peut être une cause de cyclopie chez l'embryon humain, avec la formation d'un œil unique médian. Il est probable que la signalisation Shh, connue pour être nécessaire à la spécification correcte des structures de la ligne médiane ventrale du cerveau, soit à l'origine de la diminution normale de la synthèse de Pax6 et d'autres facteurs de transcription sur la ligne médiane du prosencéphale. Comme cela a été discuté Chapitre 1 (voir Encart 1F), une absence de signalisation Shh peut conduire à l'holoprosencéphalie, qui dans sa forme la plus sévère se traduit par un défaut de subdivision du prosencéphale en hémisphères droit et gauche, une perte des structures faciales médianes et une cyclopie.

Plus tard, l'organisation dorso-ventrale de la cupule optique requiert la signalisation ventrale Shh et dorsale BMP-4, comme ailleurs dans le système nerveux central. D'autres signaux incluant Notch, diverses BMP, Wnt, FGF, TGF- β et l'acide rétinoïque, dont certains d'entre eux, produits par les crêtes neurales entourant la cupule optique, sont essentiels pour induire et entretenir la différenciation des cellules dans des régions variées de la cupule optique. Ainsi, par exemple, *Fgf9* est exprimé dans une région de la cupule optique qui donnera la rétine neurale. L'expression de *Fgf9* ectopique conduit à une duplication de la rétine neurale, alors que l'absence d'expression de *Fgf9* provoque l'extension de l'épithélium pigmentaire rétinien dans la région qui normalement donne la rétine neurale.

D'un bout à l'autre du règne animal le même jeu de facteurs de transcription est essentiel pour la formation de l'œil. *Pax6* est l'exemple classique d'un gène à la fonction de base conservée. Il est nécessaire au développement des structures sensibles à la lumière chez tous les bilatériens (animaux à symétrie bilatérale), depuis les organes simples sensibles à la lumière des planaires jusqu'aux yeux composés des insectes et les yeux caméra des vertébrés et des céphalopodes.

Identifié à l'origine à partir de l'analyse génétique de mutations suscitant un développement anormal de l'œil chez la souris et l'espèce humaine, *Pax6* est l'homologue du gène *eyeless* de la drosophile. Les embryons de souris avec une fonction altérée de *Pax6* ont des yeux plus petits que la normale ou pas d'yeux du tout. Les individus hétérozygotes pour des mutations de *PAX6* ont des anomalies variées de l'œil

Fig. 11.48 *Pax6* est un gène maître pour le développement de l'œil. a, L'expression ectopique de *Pax6* de souris dans un disque d'antenne chez la drosophile provoque le développement d'yeux sur l'antenne. b, Vue à fort grossissement de l'œil ectopique.

Reproduction photographique avec l'autorisation de Gehring, W.J. : **New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors**. J. Hered. 2005, **96** (3) : 171-184.`



Fig. 11.49 Les deux formes d'Astyanax *mexicanus.* Les poissons de surface possèdent des yeux et sont pigmentés (photo du haut). Les formes cavernicoles sont dépourvues d'yeux et de pigmentation.

Photographie aimablement communiquée de A. Strickle, Y. Yamamoto, and W. Jeffery.



collectivement connues sous le terme de **aniridie**, en raison de l'absence totale ou partielle de l'iris. Ces patients ont aussi des troubles cognitifs, *PAX6* ayant plusieurs rôles dans le développement du cerveau. Dans les très rares individus homozygotes pour des mutations de *PAX6*, l'absence d'yeux peut être associée à d'autres malformations sévères pouvant être incompatibles avec la vie.

L'injection d'ARNm *Pax6* dans un blastomère du pôle animal d'un embryon de xénope au stade 16 cellules, conduit à la formation de structures oculaires ectopiques, avec des cristallins et des cupules optiques bien formés, sur la tête du têtard. Encore plus étonnant, l'expression ectopique de *Pax6* de souris, xénope, ascidie ou calmar dans des disques imaginaux de la drosophile conduit au développement d'ommatidies de l'œil composé de type drosophile sur des structures adultes telles que les antennes (Fig. 11.48).

Un autre facteur de transcription, Six3, est aussi impliqué dans le développement de l'œil des vertébrés comme dans celui de la drosophile (le facteur de transcription chez la drosophile est codé par le gène *sine oculis*). Surexprimé chez l'embryon de poisson, il peut induire des structures oculaires. Ainsi apparaît l'existence d'un réseau conservé de facteurs de transcription qui régit le développement de cet organe sensoriel.

La formation du cristallin est une étape cruciale dans le développement des structures antérieures de l'œil telles que la cornée et l'iris. Parmi bien d'autres preuves, cela a été élégamment démontré par une expérience chez le poisson téléostéen Astyanax mexicanum, qui présente des formes voyantes vivant en surface et des formes aveugles cavernicoles (Fig. 11.49). Une petite ébauche optique avec une cupule optique et un cristallin se forme chez l'embryon cavernicole, mais le cristallin subit ensuite une apoptose massive. Une expansion de la signalisation Shh le long de la ligne médiane du cerveau de l'embryon est impliquée dans cette apoptose du cristallin. Celui-ci ne se développant pas, la cornée, l'iris, et les autres structures à l'avant de l'œil ne peuvent également pas se former. Le cristallin d'un Astyanax de surface greffé dans la cupule optique de la forme cavernicole au cours de l'embryogenèse, continue de croître et de se différencier, et restaure de façon spectaculaire le développement de l'œil, indiquant que l'absence du cristallin est au moins en partie responsable du non-développement de l'œil de la forme cavernicole. L'effet d'une signalisation étendue de Shh dans le développement de l'œil, a été étudié en augmentant son expression chez l'embryon de surface qui se développe normalement en un adulte voyant. Quand les ARNm Shh sont injectés dans un côté de l'embryon, lors de la segmentation, l'expression du gène Pax6 est réprimée unilatéralement dans la région correspondant à celle de l'œil en formation, et les larves qui se développent sont dépourvues d'œil sur ce côté de la tête.

11.28 La mise en place de l'organisation de l'œil chez la drosophile repose sur des interactions cellule-cellule

Les yeux composés de la drosophile adulte se développent à partir de disques imaginaux à l'extrémité antérieure de l'embryon (Fig. 2.6). L'œil composé a une structure tout à fait différente de celle de l'œil de vertébrés. Il est composé d'environ 800 organes photorécepteurs identiques, les **ommatidies**, groupés en arrangements hexagonaux réguliers comme des cristaux (Fig. 11.50). Chaque ommatidie, au terme de **Fig. 11.50** Micrographie en microscopie électronique à balayage d'un œil composé de drosophile adulte. Chaque unité est une ommatidie. Au troisième stade larvaire, l'ommatidie (insert) est constituée de huit neurones photorécepteurs (R1-R8) et de quatre cellules cônes à l'origine du cristallin de l'œil adulte (voir Fig. 11.45). L'insert montre l'orientation d'un complexe ommatidien dans la moitié dorsale de l'œil. Les ommatidies de la face ventrale sont orientées dans la direction opposée, ce qui signifie que l'œil présente une organisation en miroir de part et d'autre d'une ligne équatoriale (ligne rouge). Sur le cliché, la région dorsale est en haut et la ventrale en bas. Barre d'échelle = 50 μm.

son développement, est constituée de 20 cellules : huit neurones photorécepteurs (R1-R8), recouverts de quatre cellules cristalliniennes ou cellules cônes (qui sécrètent le cristallin), et huit cellules pigmentaires additionnelles (non représentées dans l'encart de la Fig. 11.50). L'analyse génétique du développement de l'ommatidie a fourni l'un des meilleurs modèles de l'étude de la mise en place de l'organisation d'un petit groupe de cellules. Une découverte initiale majeure a été que le patron de chaque ommatidie est spécifié par des interactions cellules-cellules et non basé sur des lignages cellulaires.

Comme cela a été vu dans la Section 11.27, le gène *Pax6* est le gène maître du développement de l'œil dans l'ensemble du règne animal. Le gène homologue de *Pax6* est *eyeless* chez la drosophile, des mutations de ce gène induisant une réduction ou une absence totale de l'œil composé. *eyeless* est exprimé dans la région du disque imaginal d'œil en avant du sillon morphogénétique (Fig. 11.51). L'expression ectopique du gène *eyeless* dans les autres disques imaginaux conduit au développement d'yeux ectopiques, sur les ailes, pattes, antennes et haltères. À noter que la structure fine de ces yeux ectopiques est normale et que des ommatidies distinctes sont présentes, bien que non connectées au système nerveux. On estime que l'expression d'environ 2 000 gènes, tous nécessaires pour la morphogenèse oculaire, est activée par Eyeless. La fonction de *eyeless* dans le disque d'œil serait similaire à celle de *vestigial* dans le disque d'aile, puisque, exprimé de façon ectopique dans ces disques, il semble changer l'interprétation de l'information de position.

L'œil se forme à partir du feuillet épithélial unistratifié du disque imaginal d'œil, localisé au pôle antérieur de la larve. La spécification et l'organisation des cellules des ommatidies commencent au milieu du troisième stade larvaire. Cette organisation commence à l'arrière du disque imaginal oculaire et progresse vers l'avant, durant deux jours environ, pendant lesquels le disque devient huit fois plus gros.

L'un des événements les plus précoces de la différenciation de l'œil est la formation du **sillon morphogénétique**, qui balaie l'ensemble du disque de l'arrière vers l'avant, en réponse à une vague de signaux qui initient le développement des ommatidies à partir des cellules du disque d'œil. Au fur et à mesure que le sillon se déplace dans l'épithélium, apparaissent en arrière de celui-ci des groupes de cellules qui donneront des ommatidies agencées de façon hexagonale (Fig. 11.51). Le sillon progresse lentement au sein du disque, à une vitesse de 2 h par rangée d'amas d'ommatidies. En arrière du sillon morphogénétique les cellules commencent à se différencier pour former les ommatidies agencées régulièrement en rangées ayant chacune d'elles des ommatidies décalées de moitié par rapport à la rangée précédente. Ceci confère à l'arrangement un aspect hexagonal caractéristique. Les premières cellules à se différencier sont les neurones photorécepteurs R8. Ils apparaissent régulièrement espacés dans chaque rangée, en étant séparés les uns des autres par environ huit cellules, cette séparation établissant le patron spatial des ommatidies.

Le passage du sillon morphogénétique est essentiel à la différenciation des ommatidies, puisque les mutations qui bloquent sa progression bloquent également la mise en place de nouvelles rangées d'ommatidies, donnant une mouche avec des yeux anormalement petits. Bien qu'il n'y ait pas de compartiment antérieur ou postérieur dans les disques d'œil, les cellules juste en arrière du sillon peuvent être considérées comme postérieures, par similitude avec le compartiment postérieur du disque d'aile (voir Section 11.20). Elles sécrètent la protéine Hedgehog, déclenchant l'expression de *decapentaplegic*, qui à son tour rend les cellules compétentes pour former du tissu neural. Le gène *wingless* joue aussi un rôle dans l'organisation du disque d'œil. Exprimé sur les bordures latérales du disque, il empêche l'apparition du sillon dans ces régions. Ainsi, même si les disques imaginaux donnent des structures très variées, les signaux clés impliqués dans l'organisation de la patte, de l'aile et de l'œil sont similaires, bien qu'ayant des rôles différents dans chaque cas.





Fig. 11.51 Développement des ommatidies de l'œil composé de

drosophile. Un œil composé se développe à partir d'une partie d'un disque imaginal d'œilantenne, également à l'origine d'une antenne. Au cours du troisième stade larvaire, le sillon morphogénétique se développe dans le disque d'œil, et progresse dans une direction postéro-antérieure. Les ommatidies se forment à l'arrière de ce sillon, les neurones photorécepteurs étant spécifiés dans l'ordre indiqué, avec R8 en premier et R7 en dernier. Les ommatidies s'agencent en un réseau régulier de forme hexagonale.

Illustration d'après Lawrence, P. : **The Making of a Fly**. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992. Une fois spécifiée, chaque cellule R8 initie une cascade de signaux qui à la fin recrutent un amas de 20 cellules constituant l'ommatidie mature. Les premières cellules recrutées sont les futures cellules photoréceptrices qui sont des **neurones sensoriels**. De chaque côté de R8, R2 et R5 se différencient en deux neurones fonctionnellement identiques. R3 et R4, qui sont des photorécepteurs de type légèrement différent, se spécifient ensuite. Toutes ces cellules se disposent en un demi-cercle autour de R8. R1 et R6 se différencient alors et complètent le cercle, qui est finalement refermé par la différenciation de R7, adjacent à R8 (voir Fig. 11.51).

Les agrégats cellulaires subissent ensuite une rotation de 90°, si bien que R7 se trouve la plus proche de l'équateur du disque, et R3 la plus éloignée. La rotation s'effectue dans des directions opposées dans les moitiés dorsales et ventrales de l'œil, ce qui signifie que ces deux régions ont des polarités distinctes et différentes, les ommatidies des faces dorsales et ventrales par rapport à l'équateur ayant une symétrie en miroir (voir Fig. 11.50). La polarité des ommatidies est encore un autre exemple de polarité cellulaire planaire (voir Encart 2I) et implique un niveau plus élevé de la signalisation Frizzled dans R3 que dans R4.

La détermination de la zone équatoriale de l'œil résulte de la spécification de la région dorsale du disque d'œil par des membres du complexe génique Iroquois. Cette dernière est suivie de la spécification de l'équateur lui-même, qui implique les actions de Notch et de ses ligands Serrate et Delta, de façon comparable à la spécification de la frontière entre les compartiments dorsal et ventral de l'aile (Section 11.21).

Dans l'œil, l'espacement régulier des ommatidies repose sur une **inhibition latérale** qui espace les cellules R8. Au début, formant un groupe d'équivalence, toutes les cellules du disque d'œil ont la capacité de se différencier en cellules R8, ce qu'elles font quand le sillon morphogénétique les balaie. Mais certaines prennent de l'avance et peuvent ainsi inhiber la différenciation d'une autre R8 sur une distance d'environ trois fois son diamètre. Les cellules qui donneront des R8 expriment le gène *atonal*. La protéine sécrétée Scabrous et Notch sont des inhibiteurs de *atonal* qui espacent les cellules R8. Dans l'œil, le devenir des cellules est spécifié et déterminé cellule par cellule et non au sein d'un groupe cellulaire.

Le récepteur de l'EGF de la drosophile (ou DER pour *Drosophila EGF Receptor*) et son ligand Spitz, une molécule attachée à la membrane et apparentée à l'EGF, sont deux protéines majeures dans la mise en place de l'organisation d'une ommatidie. Cette mise en place serait basée à la fois sur l'activation du récepteur de l'EGF et l'âge des cellules (Fig. 11.52). Produit par les trois cellules, R8, R2 et R5, les plus centrales et les premières spécifiées, Spitz active le récepteur de l'EGF sur les cellules adjacentes, ce qui recrute R3, R4, R1, R6 et R7 pour devenir photoréceptrices. Celles-ci produisent la protéine Argos qui diffuse et empêche Spitz d'activer des cellules

plus éloignées, évitant ainsi toute autre cellule de l'amas ommatidien présomptif de se développer en photorécepteur. L'âge de la cellule déterminerait la vraie nature de chaque photorécepteur, les cellules passant par plusieurs états, chacun d'eux correspondant à un devenir potentiel. D'autres signaux sont également impliqués. La différence par exemple entre R3 et R4 implique la signalisation Notch ; la cellule avec un taux élevé d'activité Notch est inhibée pour devenir R3 et devient R4. Une fois les photorécepteurs différenciés, apparaissent les quatre cellules cristalliniennes formant le cristallin, et enfin la couronne de cellules accessoires.

La spécification de R7 comme photorécepteur est l'un des cas les mieux compris de la spécification du devenir individuel d'une cellule. Elle requiert l'expression du gène *sevenless* dans la future R7 et de *bride-of-sevenless* (*boss*) dans R8. Si l'un ou l'autre de ces gènes est inactivé, le phénotype est le même, R7 ne se développe pas et un cristallin surnuméraire se forme. La protéine Sevenless est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, et Boss son ligand. Sevenless est produite non seulement par R7 mais aussi par d'autres cellules de l'ommatidie, dont les cellules cônes. La production de Sevenless est donc une condition nécessaire mais non suffisante pour la spécification de R7. Des mosaïques génétiques ont montré que le développement de R7 nécessitait la production de la protéine Boss par R8, ce qui constitue le signal par lequel R8 induit R7. Boss est aussi une protéine membranaire intégrée, présente sur la face apicale de R8 où elle entre en contact avec R7. Un second signal pour R7 est fourni par le couple R1/R6 qui doit activer Notch dans la cellule R7.

RÉSUMÉ

Le développement de l'œil de vertébrés résulte d'une extension du prosencéphale. L'évagination des parois latérales du diencéphale forme les vésicules optiques, qui à leur tour induisent la formation du cristallin à partir de l'ectoderme superficiel. L'invagination de l'extrémité de la vésicule optique produit une cupule optique à deux feuillets, qui entoure le cristallin et forme le globe oculaire. Le feuillet épithélial interne donne la rétine neurale et le feuillet externe se développe en épithélium pigmentaire en arrière de la rétine. La vésicule optique présente une capacité remarquable d'auto-organisation, mais le développement ultérieur de l'œil implique le cristallin. Le facteur de transcription Pax6 est essentiel au développement de l'œil chez des animaux aussi différents que les vertébrés et la drosophile. L'œil composé de la drosophile contient environ 800 ommatidies, arrangées selon un patron hexagonal régulier se développant à partir d'un disque imaginal. L'inhibition latérale par le photorécepteur R8 permet l'espacement régulier des ommatidies. Le patron des huit photorécepteurs de chaque ommatidie est dû à des interactions cellules-cellules, par lesquelles les photorécepteurs sont spécifiés et se différencient selon un ordre strict initié par R8.



Fig. 11.52 Recrutement séquentiel des photorécepteurs et des cellules cônes lors de la formation d'une ommatidie. Les trois cellules photoréceptrices les plus précocement spécifiées et localisées de manière centrale, R8, R2 et R5, produisent la protéine Spitz. Celle-ci active le récepteur à l'EGF (DER) dans les cellules voisines, R3, R4, R1, R6 et R7, ce qui leur confère une destinée de photorécepteur (schéma du haut). Ces dernières produisent alors également Spitz, qui interagissant avec DER porté par les futures cellules cônes (c), entraîne le recrutement de ces dernières dans l'ommatidie. Une fois déterminées, ces cellules sécrétent la protéine Argos qui en diffusant, empêche les cellules plus éloignées d'être activées par Spitz, ce qui limite le nombre de cellules à se développer en photorécepteurs au sein du futur complexe ommatidien.

D'après Freeman, M. : **Cell determination strategies in the Drosophila eye.** Development 1997, **124 :** 261–270.

RÉSUMÉ: développement des ommatidies de l'œil de drosophile

Drosophile

L'expression du gène *eyeless* est nécessaire au développement des yeux. Le sillon morphogénétique progresse au travers du disque d'œil et est associé à des signaux Decapentaplegic et Hedgehog

Les huit photorécepteurs de la future ommatidie commencent à se différencier postérieurement au sillon morphogénétique ; R8 se formant en premier et R7 en dernier Les ommatidies sont espacées grâce à une inhibition latérale



Fig. 11.53 Exemples de morphogenèse ramifiée. a, Système trachéen embryonnaire de drosophile. b, Système vasculaire embryonnaire de poisson-zèbre. c, Rein embryonnaire de souris. d, Glande mammaire de ratte vierge. Les épithéliums ramifiés sont visualisés par un marquage anticorps (a, c) ou par une coloration histologique (d) ou par la fluorescence d'un gène rapporteur (b).

(a) reproduit avec l'autorisation de Luschnig, S., et al. : Serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in Drosophila. Curr Biol. 2006, 24, 16: 186-194.



(b) aimablement communiqué par Ochoa-Espinosa, A., Affolter, M. : d'après Branching Morphogenesis : From cells to organs and back. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012, 4: a008243. (c) Photographie aimablement communiquée par J. Davies. (d) D'après Schedin, P., et al. : Microenvironment of the involuting mammary gland mediates mammary cancer progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2007, 12: 71-82.

Les poumons des vertébrés et le système trachéen des insectes

Toutes les structures évoquées précédemment sont externes, ce qui a rendu leur étude relativement facile. Concernant maintenant certains organes internes, un trait particulier de leur développement non encore rencontré, est la formation et la ramification d'un épithélium tubulaire. Les épithéliums constituent le type le plus commun de l'organisation tissulaire chez les animaux, et beaucoup d'organes chez les mammifères, comme les poumons, reins et glandes mammaires, sont composés principalement d'épithéliums fonctionnellement spécialisés. Les cellules épithéliales adhèrent fortement les unes aux autres réalisant un feuillet cellulaire qui peut être simple, comme les alvéoles pulmonaires, ou pluristratifié par exemple au niveau de la peau. Un trait commun des organes qui seront d'abord considérés est que leur épithélium forme des structures tubulaires ramifiées, phénomène connu sous le terme de morphogenèse ramifiée. Le développement du système vasculaire des vertébrés en un réseau complexe de vaisseaux sanguins interconnectés et délimités par une simple couche épithéliale, l'endothélium, et celui du réseau tubulaire du système trachéen des insectes, impliquent d'importants processus de ramification (Fig. 11.53).

Les organes internes des vertébrés tels que les poumons, le pancréas et les glandes mammaires, ont tous un développement qui débute par des bourgeons épithéliaux. Le site où ces bourgeons se développent est déterminé dans le mésoderme comme une partie du processus de mise en place du plan corporel. Ainsi, comme pour le développement des membres, c'est le mésoderme qui contient l'information de position qui détermine où les organes se développent. Des interactions réciproques entre le bourgeon épithélial et le mésenchyme mésodermique qui lui est associé sont nécessaires pour l'excroissance du bourgeon et déterminent sa morphogenèse ramifiée.

Le rôle crucial du mésenchyme a d'abord été montré dans une expérience classique dans laquelle le bourgeon épithélial d'une glande mammaire en formation a été recombiné avec du mésenchyme d'une glande salivaire précoce. Le patron de la ramification épithéliale de ces deux glandes est assez différent et l'épithélium de glande mammaire, combinée avec le mésenchyme salivaire, se ramifie selon un type glande salivaire. Malgré cette morphogenèse anormale, les cellules épithéliales se différencient encore en cellules de glande mammaire et produisent du lait quand elles sont stimulées. Une analyse de comment la morphogenèse ramifiée se réalise sera ici détaillée en prenant le poumon comme exemple.

11.29 Les poumons de vertébrés se développent par ramification de tubes épithéliaux

La paire de poumons des vertébrés se développe à partir de deux bourgeons endodermiques (Fig. 11.54) qui apparaissent de chaque côté de l'extrémité de la trachée embryonnaire et forment latéralement des excroissances épithéliales tubulaires à l'origine des bronches. Le poumon est l'un des organes internes qui possèdent une asymétrie gauche-droite (voir Section 5.16), celle-ci se manifestant très précocement lors du développement. Chez l'espèce humaine, le bourgeon bronchique de droite se divise en trois bronches et celui de gauche en deux. Celles-ci forment des rameaux de



Fig. 11.54 La morphogenèse du poumon de souris implique l'excroissance et la ramification de bourgeons bronchiques. L'épithélium des voies aériennes pulmonaires se développe par des ramifications successives de bourgeons bronchiques en réponse à des signaux provenant du mésenchyme environnant. Les figures du haut montrent des montages *in toto* de poumons (en vue ventrale) à différents stades embryonnaires, immunomarqués pour la cadhérine E afin de visualiser l'épithélium. G, lobe gauche ; DAc, lobe accessoire ; DCr, lobe droit cranien ; DCd, lobe droit caudal ; DMd, lobe droit médian. Barre d'échelle = 500 µm. Trois modes de base de ramification (figure du bas à gauche) sont utilisés de manière répétitive et combinée. Le mode le plus simple est la bifurcation plane, montrée ici dans un poumon d'un embryon de souris à E16 (figure du bas à droite). G2, rameau issu de la branche initiale gauche. Les ramifications séquentielles se réalisent dans le même plan. A, rameau antérieur ; P, rameau postérieur. Barre d'échelle = 100 μm.

Photographies aimablement communiquées par R. Metzger from Metzger, R.J., et al. : **The branching programme of lung development.** Nature 2008, **453 :** 745-750. plus en plus fins, les bronchioles, qui se terminent en petits sacs alvéolaires délimités par un mince épithélium lamellaire en contact intime avec un système hautement ramifié de capillaires sanguins qui se développe au même moment. C'est au niveau des alvéoles que se produiront les échanges gazeux après la naissance, l'oxygène y étant absorbé et le dioxyde de carbone libéré par le sang.

L'excroissance et la ramification des tubules bronchiques des poumons de vertébrés résultent d'une prolifération cellulaire, qui est plus grande à l'extrémité du tube en croissance. Wnt-5a, qui agit *via* la voie de la polarité planaire (voir Encart 8C), est synthétisée aux extrémités des tubules pulmonaires et contrôle la croissance de ces derniers. Les souris dépourvues de Wnt-5a ont une trachée tronquée qui se ramifie d'une manière excessive. Il a été vu que Wnt-5a contrôle l'excroissance de la patte en contrôlant le comportement orienté des cellules (voir Section 11.4) et il pourrait contrôler l'excroissance tubulaire pulmonaire de la même façon bien que cela ne soit pas encore démontré.

Les patrons des ramifications tubulaires du poumon en cours de formation chez la souris ont été analysés plus en détail. Seuls trois modes de ramification, utilisés sous différentes combinaisons et à différents moments, peuvent rendre compte de l'arborescence tubulaire complexe qui se développe (voir Fig. 11.54). L'apparition et l'excroissance des tubules à partir du tube bronchique principal dépendent d'interactions de l'épithélium tubulaire avec le mésenchyme qui l'entoure. Le responsable principal du bourgeonnement est FGF-10 sécrétée localement par les cellules mésenchymateuses, et qui interagit avec le récepteur FGFR2b exprimé à la surface des cellules épithéliales. Ainsi, les sites où les cellules mésenchymateuses voisines de l'épithélium pulmonaire expriment Fgf10 déterminent le patron ramifié. L'activation de FGFR2b induit l'expression du gène Sprouty dans les cellules épithéliales, gène qui a été identifié initialement par une mutation qui augmente chez la drosophile la ramification du système trachéen. La protéine Sprouty est contrôlée par la signalisation FGF dont elle contrarie l'activité, et dans les poumons elle exerce un rétrocontrôle négatif empêchant les cellules du tube principal éloignées de l'extrémité de former des ramifications.

Produite dans les cellules endodermiques à l'extrémité des tubes en extension, Shh est une autre protéine de signalisation essentielle pour le développement pulmonaire. Elle inhibe l'expression de *Fgf10* dans le mésoderme, qui en retour inhibe sa synthèse dans l'endoderme. Un modèle de réaction-diffusion (voir Encart 11E) basé sur ces interactions peut mimer le mode de bifurcation conduisant à la ramification pulmonaire. Des protéines BMP, Wnt et Notch, ainsi que l'acide rétinoïque, sont aussi des composants du réseau complexe de molécules de signalisation interagissant au sommet de chaque extrémité des tubes en extension et qui organise l'excroissance et les ramifications.

11.30 Le système trachéen de la drosophile est un exemple type de morphogenèse ramifiée

Le développement du **système trachéen** de la drosophile, qui approvisionne les tissus en oxygène, constitue un excellent modèle d'étude de la morphogenèse ramifiée. Des gènes comme *Sprouty* ont été découverts grâce à des mutants de drosophile chez lesquels la ramification du système trachéen est anormale, et leurs homologues identifiés par la suite comme contrôlant les ramifications pulmonaires des vertébrés.

L'air pénètre dans le système trachéen de la larve de drosophile par des orifices dans la paroi corporelle appelés stigmates, et l'oxygène est distribué aux tissus par quelque 10 000 fins tubules qui se développent à partir de 20 placodes ectodermiques (10 de chaque côté) durant l'embryogenèse. Chaque placode produit le système trachéen pour une moitié latérale d'un segment entier de la larve. Au moment où débute le mouvement de rétraction de la bandelette germinative, vers la fin du développement embryonnaire (voir Section 2.2), la placode ectodermique s'invagine et forme un sac creux d'environ 80 cellules, qui sera à l'origine, suite à des ramifications successives, de centaines de fines ramifications terminales. Il est à noter que l'extension des sacs pour former les tubes ramifiés n'est pas le fait d'une quelconque prolifération mais d'une migration cellulaire vectorielle, d'un arrangement cellulaire par intercalation, et de changements de forme. Le développement progressant, les ramifications des différentes placodes fusionnent pour former un large réseau corporel de tubes interconnectés (voir Fig. 11.54).



L'invagination initiale d'une placode trachéenne implique la constriction des surfaces cellulaires apicales et des changements de la forme cellulaire, très semblables à ceux observés lors de l'internalisation du mésoderme chez la drosophile (voir Fig. 9.23). Les premiers tubules sont formés quand certaines cellules de la paroi du sac émettent des filopodes, qui les rendent capables de migrer vers la source d'un chimio attractant, en étirant un tube allongé de cellules derrière elles (Fig. 11.55). Ces tubes se ramifient ensuite par le jeu d'une intercalation cellulaire et d'un remodelage des jonctions intercellulaires pour produire des tubules secondaires composés de simples cellules attachées à la queue leu leu, chacune d'elle s'enroulant sur elle-même pour former la lumière du tubule. Le chimioattractant guidant l'extension des tubes est la protéine Branchless, homologue des protéines FGF des mammifères. Elle est émise par des amas de cellules épidermiques sus-jacentes localisés selon un patron déterminé par le plan d'organisation antéro-postérieur et dorso-ventral de l'embryon. Branchless agit par l'intermédiaire de l'homologue du récepteur du FGF des mammifères, appelé Breathless, qui est exprimé dans les cellules trachéennes et qui est aussi impliqué dans l'initiation de la ramification. Les gènes tels que breathless et branchless ont été identifiés par des mutations qui perturbaient la morphologie trachéenne, d'où leurs noms. Un autre gène de ce type est sprouty qui est exprimé par les cellules trachéennes. La protéine Sprouty prévient un excès de ramifications en étant antagoniste de la signalisation Breathless, qui empêche les cellules les plus proximales de former des ramifications. En absence de Sprouty, beaucoup plus de ramifications secondaires se forment par rapport à la normale.

Ainsi, de façon remarquable, les molécules impliquées dans la régulation des ramifications précoces du système respiratoire de la larve de drosophile sont les mêmes que celles qui régulent la ramification des poumons embryonnaires des mammifères. Il a été estimé, à partir d'un criblage des mutations affectant la croissance du tube trachéen et sa ramification, que plus de 200 gènes sont nécessaires pour construire le système trachéen de la drosophile. Ces criblages ont permis d'identifier de nouveaux gènes qui interviennent non seulement dans la morphogenèse ramifiée de ce système trachéen mais aussi dans celle des poumons des mammifères.

Alors que les tubules s'étendent dans le corps de la larve, des niveaux faibles d'oxygène provoquent une expression locale de *branchless* dans l'épiderme. En réponse, la signalisation Breathless induit les cellules aux extrémités des tubules secondaires à émettre les fines ramifications terminales du système trachéen. Chaque cellule terminale forme un bourgeon unicellulaire pluriramifié, avec la lumière des tubules formée dans la cellule elle-même (voir Fig. 11.55). Une ramification terminale excessive est évitée par une signalisation Delta-Notch, qui assigne son destin à la cellule terminale et évite que les cellules hors de l'extrémité ne deviennent des cellules terminales et soient capables de former des ramifications terminales. Fig. 11.55 La ramification du système trachéen de la drosophile est uniquement le résultat de réarrangements et de remodelages cellulaires. Dans le premier stade du développement trachéen, la sécrétion localisée de la protéine Branchless (en bleu) conduit les cellules épithéliales du sac trachéen à émettre des filopodes et à se déplacer vers la source de Branchless, créant un rameau primaire dont les parois sont formées de deux cellules côte à côte (figure de gauche). Un rameau secondaire est formé par l'intercalation de cellules entre elles et un enroulement des cellules sur elles-mêmes conduit à la formation d'un tube fait d'une seule couche de cellules placées à la queue leu leu, avec une lumière courant au centre (figure du milieu). Au sommet du rameau secondaire, l'expression du gène sprouty est induite, et la protéine Sprouty (en vert) inhibe une ramification au plus loin de la source de Branchless. Les cellules des extrémités qui entreprennent une ramification terminale sont maintenant spécifiées par la signalisation Delta-Notch. Une cellule terminale émet des expansions cytoplasmiques qui se creusent d'une lumière et qui se ramifient largement (figure de droite). Les cellules en arrière de l'extrémité sont inhibées par le signal Notch (lignes rouges barrées) les empêchant de devenir des cellules terminales.

RÉSUMÉ

Les poumons des vertébrés et le système trachéen des insectes sont des exemples d'une morphogenèse ramifiée d'un épithélium tubulaire. Dans les deux systèmes, le patron de la ramification dépend de signaux locaux issus des cellules mésenchymateuses environnantes et un rétrocontrôle négatif de la part de l'extrémité des bourgeons épithéliaux évite une ramification excessive. Les protéines de signalisation qui régulent la ramification sont les mêmes pour les systèmes de vertébrés et d'insectes.

Les vaisseaux sanguins et le cœur des vertébrés

Le système sanguin, qui inclut les vaisseaux sanguins et les cellules sanguines, est l'un des premiers systèmes organiques à se développer chez les embryons de vertébrés. Son développement précoce n'est guère surprenant dans la mesure où de l'oxygène et des nutriments doivent être délivrés rapidement aux tissus se différenciant et aussi aux organes en formation. Le développement du système sanguin implique non seulement une morphogenèse ramifiée mais aussi la formation de structures tubulaires par le biais d'une transition mésenchymato-épithéliale (voir Section 9.3), avec le cœur apparaissant à partir du tube mis en place ventralement par rapport à l'intestin antérieur. Il y a d'intéressants parallèles entre le développement du système vasculaire des vertébrés et le système trachéen des insectes, qui malgré une origine très différente, possèdent la même fonction de convoyer de l'oxygène aux tissus.

11.31 Le système sanguin se développe par vasculogenèse à laquelle succède une angiogenèse

Les cellules type caractéristiques du système vasculaire sont les **cellules endothéliales**, qui délimitent l'ensemble du système circulatoire, comprenant le cœur, les veines et les artères. Le développement des vaisseaux sanguins débute avec des cellules mésodermiques précurseurs des cellules endothéliales appelées **angioblastes**. Ceux-ci engagent une transition mésenchymato-épithéliale (voir Section 9.3) et migrent pour former des chaînes de cellules qui s'assemblent en un réseau primitif de vaisseaux selon un processus nommé **vasculogenèse** (Fig. 11.56). Un exemple plus criant de transition mésenchymato-épithéliale est observé avec la formation du rein. Concernant le développement des vaisseaux sanguins, les premiers formés par vasculogenèse sont ensuite remaniés par un processus d'**angiogenèse** en un système vasculaire ramifié dans tout le corps. Les vaisseaux en croissant et en se ramifiant forment un large réseau de capillaires faits de veinules et d'artérioles qui peuvent évoluer en veines et en artères. Les vaisseaux fusionnent également les uns avec les autres et réalisent des anastomoses (rapprochement et jonction de deux ramifications au départ séparées) créant un réseau complexe de vaisseaux sanguins interconnectés.

La différenciation des angioblastes en cellules endothéliales nécessite le facteur de croissance VEGF (pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) et ses récepteurs. Le VEGF est aussi un puissant mitogène pour les cellules endothéliales en stimulant leur prolifération. Les vaisseaux sanguins majeurs, telles que l'aorte dorsale et les veines principales, se forment à partir d'angioblastes situés dans le mésoderme des lames latérales. Le VEGF est sécrété par certaines structures telles que les somites, et son expression est activée par la signalisation Shh dans la chorde. L'expression du gène *Vegf* est induite par un manque d'oxygène ou hypoxie, et ainsi un organe actif utilisant de l'oxygène promeut sa propre vascularisation.

Les nouveaux capillaires sanguins sont formés par bourgeonnement à partir de vaisseaux sanguins pré-existants. Le processus est très similaire de celui de la ramification trachéenne, bien qu'ici le chimio attractant soit le VEGF plutôt que Branchless, et que la prolifération cellulaire soit impliquée dans la croissance et la ramification des capillaires, alors que la croissance du système trachéen est due à un réarrangement cellulaire (Fig. 11.57). Les cellules à l'extrémité d'un bourgeon émettent des expansions du type filopode qui guident et étirent l'excroissance. La réponse des cellules terminales



Informations supplémentaires concernant le developpement du rein **Fig. 11.56** Vasculogenèse et angiogenèse. Première photo : angioblastes migrant en chaînes, première étape de la vasculogenèse qui aboutit à la formation de simples tubes. Des angioblastes isolés au temps T1 sont indiqués en rouge et au temps T2 en vert pour montrer les mouvements, les flèches indiquant leurs directions. Les cellules encerclées sont immobiles. Barre d'échelle = 200μ m. Les autres photographies montrent des bourgeonnements au cours de l'angiogenèse dans les systèmes modèles utilisés pour étudier le processus : (a) rétine de souris ; (b) formation d'un vaisseau inter-somitique chez le poisson-zèbre ; (c) formation de vaisseaux sanguins en culture à partir d'un agrégat de cellules ES de souris. Illustration du haut d'après Sato, Y., et al. : *Dynamic analysis of vascular morphogenesis using transgenic quail embryos.* PLoS One 2010, *5* : e12674.

a-c, d'après Guedens, I., Gerhardt, H. : **Coordinating blood vessel formation during blood vessel formation.** Development 2011, **138 :** 4569-4583.

au VEGF est d'exprimer le ligand de Notch, Delta-Like4, qui ensuite active Notch dans les cellules voisines proximales. La signalisation Notch bloque l'expression du récepteur du VEGF. C'est l'un des mécanismes qui confine l'excroissance à l'extrémité du tube et qui est une réminiscence du mécanisme de rétrocontrôle Delta-Notch employé pour le développement trachéen chez la drosophile (voir Section 11.30).

Durant leur développement, les vaisseaux sanguins suivent des voies spécifiques vers leurs cibles, avec les filopodes en tête de la progression qui répondent à la fois au chimio attractant et aux signaux répulsifs émis par d'autres cellules et présents dans la matrice extracellulaire. Les signaux de la matrice extracellulaire sont fournis par des protéines de type nétrine et sémaphorine, qui peuvent agir sur l'extrémité des vaisseaux sanguins en croissance pour bloquer l'activité des filopodes. Les nétrines et les sémaphorines sont aussi impliquées dans le guidage des axones (voir Chapitre 12), et il y a une similitude étroite dans les signaux et les mécanismes qui guident le développement des vaisseaux sanguins et des neurones. La morphogenèse des vaisseaux sanguins nécessite aussi une modulation de l'adhésivité entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire, et entre les cellules endothéliales elles-mêmes.

Des modifications de l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'intégrines au niveau de contacts focaux sont particulièrement importantes dans ce contexte. Le VEGF stimule les cellules endothéliales à dégrader leur lame basale, à migrer et à proliférer. Dans la peau des souris, les nerfs embryonnaires constituent un modèle qui guide la croissance des artères. Les nerfs sécrètent du VEGF, qui peut à la fois attirer les vaisseaux sanguins et les spécifier en artères. Dans les poumons, la mise en place de la vascularisation ramifiée est coordonnée avec celle de l'épithélium bronchique, bien que les vaisseaux principaux puissent se développer en absence des poumons. Beaucoup de tumeurs solides produisent du VEGF et d'autres facteurs de croissance qui stimulent l'angiogenèse. Bloquer la formation de nouveaux vaisseaux est l'un des moyens de réduire une croissance tumorale. Divers inhibiteurs ciblant le VEGF sont utilisés ou sont en cours d'approbation pour traiter des tumeurs solides. D'autres inhibiteurs qui ciblent des molécules impliquées dans la stabilité des vaisseaux sanguins sont aussi en cours d'étude.

Les premières structures tubulaires vasculaires sont formées par des cellules endothéliales, et ces fragiles vaisseaux aux parois fines sont ensuite recouverts par des cellules du tissu conjonctif appelées péricytes et par des cellules musculaires lisses. Les artères et les veines sont définies par la direction du flux sanguin, aussi bien que par des différences structurales et fonctionnelles. Il a été montré grâce à un suivi des lignages cellulaires que les angioblastes sont spécifiés en tant que cellules artérielles ou veineuses avant qu'ils ne forment des vaisseaux sanguins, leur identité restant néanmoins encore labile. Les capillaires veineux et artériels se rejoignent dans des lits capillaires, qui forment des lieux d'échange entre les systèmes sanguins veineux et artériels. L'éphrine B2, molécule de tri cellulaire et de guidage (voir Encart 9D), est produite dans les vaisseaux sanguins artériels alors que son récepteur EphB4 est synthétisé dans les vaisseaux veineux. Leur interaction dans les réseaux capillaires primaires peut être nécessaire pour trier les cellules endothéliales constitutives de vaisseaux artériels et veineux distincts. Les vaisseaux lymphatiques font aussi partie du développement du système vasculaire en se formant par bourgeonnement à partir des veines. L'expression du gène à homéoboîte Prox1 indique un stade précoce de détermination du lignage lymphatique.





Fig. 11.58 Développement schématique

du cœur humain. À 15 jours du développement embryonnaire humain, les précurseurs cardiogéniques ont formé un croissant, comme le montre la première figure à gauche. Les deux bras de ce croissant en fusionnant le long de la ligne médiane, forment un tube cardiaque linéaire, qui s'allonge et se régionalise suivant l'axe antéro-postérieur, formant les régions et les cavités du cœur mature (seconde figure). Après flexion (troisième figure), ces régions acquièrent approximativement leurs positions finales. Le développement ultérieur consiste en un modelage plus poussé (quatrième figure) et la formation des valvules entre les oreillettes et les ventricules, par exemple. VAV : région de la valvule auriculoventriculaire.

D'après Srivastava, D. and Olson, E.N. : 2000.

Fig. 11.57 Excroissance et ramification de nouveaux vaisseaux au cours de l'angiogenèse. Figure de gauche : Lors de la première étape de l'angiogenèse, une sécrétion localisée de VEGF (en bleu) provoque la formation de filipodes et un déplacement vers la source de VEGF des cellules endothéliales voisines des vaisseaux sanguins pré-existants. Le

source de VEGF des cellules endothéliales voisines des vaisseaux sanguins pré-existants. Le VEGF stimule aussi la prolifération et le réarrangement des cellules endothéliales, et donc la formation de nouvelles ramifications. La production de Delta est augmentée dans les cellules terminales (en vert) du bourgeon, conduisant à une activation de Notch dans les cellules voisines, ce qui les empêche de devenir des cellules terminales. Ces cellules deviennent des cellules du corps de la ramification et une lumière se forme. Figure de droite : Ce mécanisme de ramification est très proche de celui du système trachéen de la drosophile mis à part le fait qu'une prolifération cellulaire est impliquée.

D'après Ochoa-Spinosa, A., Affloter, M. : **Branching Morphogenesis : From Cells to Organs and Back**. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012 ; doi : 10.1101/cshperspect.a008243.

L'angiogenèse n'est pas une propriété exclusive de l'embryon. Elle peut se produire tout au long de la vie, et convenablement régulée, elle est un moyen de réparation des vaisseaux sanguins endommagés. Une angiogenèse, excessive ou anormale, est cependant le signe de beaucoup de maladies humaines, dont le cancer, l'obésité, le psoriasis, l'athérosclérose et l'arthrite. Les affections humaines rattachées au système nerveux impliquant des anomalies de la vascularisation, comportent la démence vasculaire, où des ischémies vasculaires constituent la cause majeure des symptômes de la maladie et de la maladie des motoneurones.

11.32 Le développement du cœur des vertébrés implique la morphogenèse et la régionalisation d'un tube mésodermique

Le cœur est le premier organe à se former dans l'embryon. Il est principalement d'origine mésodermique et est d'abord mis en place par la fusion sur la ligne médiane ventrale des deux bras du croissant cardiogénique ou croissant cardiaque, régions des précurseurs cardiogéniques situés dans la splanchnopleure du mésoderme des lames latérales, de chaque côté du corps en dessous du repli céphalique (Fig. 11.58). Le tube unique qui en résulte comporte deux couches cellulaires, une interne de nature endothéliale, l'endocarde, et une externe, le myocarde, qui deviendra la couche musculaire contractile cardiaque. Celles-ci sont séparées par une couche de matrice extracellulaire connue sous le terme de gelée cardiaque, produite par le myocarde. Une fois formé, le tube cardiaque primitif commence rapidement à pomper le sang. Au cours de son développement ultérieur, ce tube s'allonge et deux chambres primitives le divisent transversalement, l'oreillette ou atrium et le ventricule. Une troisième couche de cellules appelée épicarde ou péricarde viscéral, se développe en un revêtement épithélial du myocarde. Le cœur comportant deux cavités est la forme adulte de base chez les poissons, mais chez d'autres vertébrés, tels que les oiseaux et les mammifères, un cloisonnement ultérieur de l'oreillette et du ventricule donne naissance à un cœur à quatre cavités. Chez l'espèce humaine, les cardiopathies



Fig. 11.59. Plusieurs populations cellulaires différentes participent à l'édification d'un cœur. Au stade le plus précoce du développement cardiaque (E7,5), illustré ici chez la souris, différentes populations de précurseurs cardiogéniques forment le croissant cardiaque (en rouge) et le second champ cardiaque (en vert), qui s'étendent de part et d'autre de la ligne médiane. Les deux bras du croissant fusionnent sur la ligne médiane sous le tube digestif antérieur en formation et un simple tube se forme qui commence par la suite à s'infléchir (E8). Les cellules du second champ cardiaque permettent l'allongement du tube cardiaque en participant à la fois aux pôles artériel (en vert sombre) et veineux (en violet) à E8,5. De plus, les cellules des crêtes neurales cardiaques (en jaune) migrent depuis les arcs pharyngiens jusqu'au pôle artériel. L'organe proépicardiaque (en bleu) se forme près du pôle veineux et migre pour former l'épicarde qui recouvre la totalité du cœur. Les contributions des diverses populations cellulaires aux cavités du tube cardiaque infléchi sont indiquées au stade E10,5. À E14,5, les cavités cardiaques sont formées et le cœur est mature. AA, arc aortique ; Ao, aorte ; BE, bourrelet endocardique ; OD, oreillette droite ; OG, oreillette gauche ; SIV, septum interventriculaire ; TA, tronc artériel ; TP, tronc pulmonaire ; VCI, veine cave inférieure ; VCS, veine cave supérieure ; VD, ventricule droit ; VG, ventricule gauche ; VP, veine pulmonaire.

D'après Vincent, S.D. and Buckingham, M. : **How to make a heart : the origin and regulation** of cardiac progenitor cells. Curr Top Dev Biol 2010, **90 :** 1–41.

congénitales touchent environ 1 % des naissances vivantes ; *in utero*, des malformations cardiaques sont responsables de la mort de 5 à 10 % des embryons (ces chiffres issus de différentes études pourraient peut-être même s'élever à 30 %).

Comme il a été vu dans le Chapitre 4, le mésoderme cardiaque du xénope est initialement spécifié par des signaux provenant de l'organisateur pendant l'induction du mésoderme et la mise en place de son organisation dorso-ventrale. Chez les embryons de poulet et de souris, les cellules qui deviendront finalement des cellules cardiaques pénètrent au niveau de la ligne primitive et vont faire partie du mésoderme des lames latérales. Quelques heures après cette pénétration, les cellules commencent à être déterminées en cellules cardiaques, et si elles sont isolées, elles se différencieront en tant que telles. Chez les souris, le suivi du lignage cellulaire dans les régions précoces cardiaques a révélé l'existence de deux lignées distinctes de cellules précurseurs cardiaques qui dérivent très tôt d'un précurseur commun, pendant ou avant la gastrulation. Une de ces lignées, la première à se différencier en muscle cardiaque, est la source exclusive des cellules myocardiques du ventricule gauche primitif, alors que l'autre est la source exclusive des cellules myocardiques du tronc artériel efférent, toutes les autres régions cardiaques étant colonisées par les deux lignées. Les cellules myocardiques se différenciant en premier sont trouvées dans le croissant cardiaque, reconnu ainsi comme le champ cardiaque primaire, cependant que la seconde lignée de cellules myocardiques se distribue de façon médiane et postérieurement au croissant, constituant le champ cardiaque secondaire.

Chez tous les vertébrés le croissant cardiaque s'étend en travers de la ligne médiane et déborde de chaque côté dans le mésoderme des lames latérales de l'embryon. Cette région entreprend ensuite une morphogenèse complexe et les cellules se déplacent vers la ligne médiane et fusionnent pour former le tube cardiaque (voir Fig. 11.59). Des mutations chez le poisson-zèbre ont été trouvées perturbant ce processus en provoquant la formation de deux cœurs positionnés latéralement, état connu sous le terme de *cardia bifida*. Un des gènes mutés est appelé *miles apart*, et code un récepteur qui lie les lysosphingolipides, la sphingosine 1-phosphate étant dans ce cas probablement le ligand. *miles apart* n'est pas exprimé dans les cellules cardiaques migrantes elles-mêmes, mais dans les cellules de chaque côté de la ligne médiane, et ainsi serait impliqué dans le guidage des cellules cardiaques présomptives en cours de migration. Les poissons-zèbres se sont avérés très utiles, *via* le criblage des mutants, pour comprendre la génétique du développement cardiaque, car leurs embryons et larves n'ont pas besoin d'avoir un cœur qui bat pour survivre.

Le second champ cardiaque apporte une contribution majeure. Résultant de mouvements morphogénétiques, il vient se placer derrière le tube cardiaque primitif dans le mésoderme pharyngien qui s'étend à la fois antérieurement et postérieurement. L'élongation du tube cardiaque dépend des contributions du second champ cardiaque, et les précurseurs cardiaques quittent la zone proliférative où ils se trouvent pour participer à la formation des extrémités antérieure (artérielle/efférente) et postérieure



(veineuse/afférente) du tube, appelés respectivement **pôle artériel** et **pôle veineux**. Les cellules précurseurs contribuant aux différentes régions cardiaques semblent acquérir des profils spécifiques d'expression génique selon leur position le long de l'axe antéro-postérieur, et cela serait dû à un gradient de signal acide rétinoïque qui établit les domaines d'expression des gènes Hox et définit aussi la limite postérieure du second champ cardiaque.

Un ajout de cellules en provenance du second champ accompagne la flexion du tube cardiaque et aussi le recrutement de cellules des crêtes neurales cardiaques dans la région efférente du cœur. La torsion asymétrique du tube cardiaque n'est pas bien comprise mais est liée à l'asymétrie gauche-droite des organes internes de l'embryon (voir Section 5.16). La Flectine, une molécule de la matrice extracellulaire, est d'abord présente uniquement sur le côté gauche, et des expériences chez le poulet suggèrent que ceci pourrait résulter de l'expression de *Pitx2* sur la gauche. Les cellules originaires des crêtes neurales contribuent à la formation du bulbe artériel, et sont indispensables, par exemple, pour la formation de l'artère pulmonaire et de l'aorte à partir du tronc artériel embryonnaire (voir Fig. 11.59). Des interactions entre les cellules des crêtes neurales et les cellules du second champ cardiaque contribuant à cette région cardiaque peuvent aussi s'avérer importantes, car lorsque les premières sont éliminées, les secondes se mettent à proliférer. Des défauts affectant le tronc artériel constituent 30 % des malformations congénitales cardiaques humaines, certaines d'entre elles étant le résultat de perturbations de la spécification et de la migration des cellules des crêtes neurales.

Juste après sa torsion, le tube cardiaque acquiert sa couche épithéliale externe, l'épicarde, dont l'importance a été récemment reconnue. L'épicarde se développe à partir d'une population distincte de cellules mésodermiques formant l'organe proépicardique situé hors du tube cardiaque, près de son extrémité postérieure, et croissant au-dessus du myocarde (voir Fig. 11.59). Certaines cellules épicardiques entament plus tard une transition épithélio-mésenchymateuse et envahissent le myocarde pour constituer le tissu conjonctif cardiaque : fibroblastes, cellules interstitielles et cellules soutenant les artères coronariennes. Les cellules endothéliales des vaisseaux coronariens migrent depuis l'endocarde de la région afférente vers la région ventriculaire après la formation de l'épicarde. Certaines d'entre elles demeurent juste en-dessous de l'épicarde, à la surface du myocarde, et forment les veines coronariennes alors que les autres envahissent le myocarde et forment les artères coronariennes. L'épicarde est essentiel pour le développement normal et la croissance du cœur, en entretenant des interactions réciproques avec le myocarde qui impliquent des molécules de signalisation incluant FGF, Shh, Wnt et Notch. Les fibroblastes cardiaques ont une grande importance en médecine, car ils sont à l'origine de la cicatrisation massive qui se produit suite à un infarctus.

Le tube cardiaque forme ensuite des cavités séparées, quatre dans le cas du cœur des mammifères. Un des processus critiques dans la genèse de ces cavités est l'établissement de structures continues tels que les septa qui séparent les cavités auriculaire et ventriculaire. Ces cloisons se forment à partir de renflements localisés à des sites précis sur des côtés opposés de la paroi interne du cœur qui forment les **bourrelets endocardiques**. Dans ces derniers, les cellules endocardiques effectuent une transition épithéliomésenchymateuse et migrent dans la gelée cardiaque de telle sorte que lorsque deux bourrelets opposés entrent en contact et se désagrègent, les cellules mésenchymateuses peuvent former un pont qui stabilise la fusion des deux bourrelets.

En revanche, les cloisons auriculaire et ventriculaire qui séparent les chambres cardiaques gauche et droite se développent à partir de crêtes falciformes myocardiques qui présentent des cellules mésenchymateuses à leurs extrémités et qui fusionnent finalement avec les cellules mésenchymateuses des bourrelets endocardiques. De telles fusions tissulaires surviennent également lors de la morphogenèse du tube neural (voir Section 9.14) et du développement de l'œil pendant la formation de la cupule optique (voir Section 11.27). Probablement l'exemple le mieux connu de fusion tissulaire est celle se produisant lors du développement de la face pour former la lèvre supérieure et le palais. En cas d'une défaillance, un bec-de-lièvre et/ou une fente palatine se produit. Ces anomalies représentent une classe très commune d'anomalies congénitales.

Un nombre croissant de facteurs de transcription est reconnu être impliqué dans la spécification du développement cardiaque et la différenciation des cellules musculaires

cardiaques. Le facteur de transcription à homéodomaine Nkx2.5, par exemple, en est l'un d'eux. C'est l'un des premiers marqueurs des cellules cardiaques précoces et il est produit dans le croissant cardiaque. Des mutations du gène *Nkx2.5* chez les souris et l'espèce humaine conduisent à des anomalies cardiaques. Le gène à boîte T, *Tbx5*, évoqué à propos du développement des membres (voir Section 11.2), est aussi un gène clé du développement cardiaque, et c'est pourquoi des patients porteurs de mutations de *Tbx5* ont à la fois des défauts au niveau des membres et du cœur. Tbx5 et un autre facteur de transcription GATA-4, en présence d'un constituant de remodelage de la chromatine, peuvent induire la formation d'un tissu myocardique pulsatile quand ils sont exprimés de manière ectopique dans le mésoderme.

Il existe de remarquables similitudes, entre les gènes impliqués dans le développement cardiaque de la drosophile et ceux des vertébrés. Le gène à homéoboîte *tinman* est nécessaire pour la formation du cœur chez la drosophile et son homologue chez les vertébrés est *Nkx2.5*. Quand les gènes *tinman-like* des vertébrés sont exprimés chez la drosophile, ils peuvent se substituer à *tinman* et restaurer certaines des anomalies causées par l'absence des fonctions du gène *tinman* normal. Chez la drosophile, l'expression de *tinman* dans le mésoderme dorsal est maintenue par la signalisation Decapentaplegic. Chez les vertébrés, les BMP, qui sont les homologues de Decapentaplegic, induisent l'expression de *Nkx2.5*. Des homologues d'autres facteurs de transcription clés du développement cardiaque chez les vertébrés sont aussi impliqués dans la formation du cœur de la drosophile, Dorsocross (un homologue de Tbx5/6) et Pannier (un homologue de GATA-4/6).

Les dents

Les dents se développent selon une série bien définie d'interactions réciproques entre l'épithélium stomodéal, qui chez les mammifères a une origine ectodermique, et le mésenchyme des bourgeons faciaux dérivé des crêtes neurales. Le premier signe du développement dentaire est une bande épaisse d'épithélium stomodéal en forme de U appelée **lame dentaire**. Le développement de chaque dent est ensuite initié dans des régions spécifiques de la lame dentaire, les bourgeons dentaires. La position du bourgeon détermine le type de dent, par exemple, incisive ou molaire. L'épithélium du bourgeon s'invagine et le mésenchyme autour se condense, l'ensemble formant un germe dentaire (Fig. 11.60). Dans chaque germe, un groupe de cellules spécialisées constituant la gelée de l'émail, agit comme un centre de signalisation pour le développement ultérieur de la couronne de la dent. Dans les dents multicuspides, telles que les molaires, la gelée de l'émail détermine la position de gelées de l'émail secondaires, qui marque l'extrémité des futures cuspides. Le mésenchyme forme la papille dentaire, qui donnera naissance à la pulpe et à la dentine, tandis que l'émail est secrété par les cellules épithéliales. La souris est utilisée comme modèle pour le développement des dents humaines bien que sa denture soit plus simple en n'ayant que deux types de dents, incisives et molaires, et seulement une seule poussée dentaire.

La formule dentaire permanente humaine pour chaque demi-mâchoire consiste, des régions distale à proximale, en deux incisives, une canine, deux prémolaires et trois molaires (Fig. 11.60, photographie en haut à gauche). Celle de la souris est une incisive et trois molaires séparées par une région dépourvue de dent (photographie en haut à droite). Les illustrations du bas de la figure 11.60 montrent les étapes initiales du développement dentaire, avec la formation du germe dentaire, sa croissance et sa morphogenèse, la formation de la gelée de l'émail, la différenciation des cellules épithéliales en adamantoblastes et mésenchymateuses en odontobastes qui produisent, respectivement, l'émail et la dentine, et les étapes finales de l'éruption de la dent.

11.33 Le développement dentaire implique des interactions épithéliomésenchymateuses et un code de gènes à homéoboîte spécifie l'identité dentaire

Le patron de base de la denture est mis en place avant que des signes externes de la formation dentaire ne se manifestent. L'épithélium stomodéal produit des signaux



Fig. 11.60 Les étapes du développement d'une dent. Les schémas représentent les étapes du développement d'une dent. Le premier signe de la formation d'une dent est l'épaississement de l'épithélium oral dans la région qui va former la dent, constituant la lame dentaire. L'épithélium oral s'invagine dans le mésenchyme dentaire, qui se condense autour de l'épithélium pour former un bourgeon. L'épithélium s'étend dans le tissu mésenchymateux et commence à englober le mésenchyme condensé, la papille dentaire, pour former la cupule dentaire; la gelée de l'émail primaire est formée. Durant le stade cloche dentaire, la disposition des cuspides apparaît et la couronne de la dent est formée. Dans les dents multicuspides de mammifères, des gelées de l'émail secondaires se forment aux sites des futures cuspides. Suivent

la croissance et la sécrétion matricielle durant lesquelles l'épithélium dentaire interne se différencie en adamantoblastes qui produisent l'émail et les cellules mésenchymateuses sous-jacentes de la papille se différencient en odontoblastes qui sécrètent la dentine qui se transformera en ivoire. La dent fait irruption à travers la surface de la mâchoire pendant que les racines continuent à se développer.

D'après Jussila and Thesleff : **Signaling networks regulating tooth** organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012.

qui, en établissant un profil spatial d'expression de gènes à homéoboîte dans le mésenchyme facial, fournit un code pour l'identité régionale de la même manière que celui fournit par l'expression des gènes Hox pour l'identité régionale le long de l'axe antéro-postérieur corporel.

Le développement de dents sera considéré ici, au niveau de la mâchoire inférieure, qui se développe à partir de la fusion des bourgeons mandibulaires. *Fgf8* est exprimé dans l'épithélium stomodéal de la région latérale de chaque bourgeon mandibulaire où les molaires se formeront et le signal FGF régule positivement l'expression de gènes codant des facteurs de transcription à homéodomaine, Barx1 et Dlx2, dans le mésenchyme sous-jacent.

Bmp4 est exprimé dans l'épithélium stomodéal de la région centrale de l'ébauche mandibulaire où les incisives se formeront et BMP-4 régule positivement l'expression des gènes codant les facteurs de transcription à homéodomaine apparentés Msx1 et Msx2 dans le mésenchyme sous-jacent tout en régulant négativement dans le même temps l'expression de Barx1. Le gène codant le facteur de transcription à homéodomaine Islet1, également impliqué dans le développement neural, est exprimé exclusivement dans l'épithélium stomodéal de la région centrale et a une interaction positive réciproque avec *Bmp4*. Les gènes codant les facteurs de transcription à homéodomaine Lim, Lhx6 et Lhx7, sont aussi exprimés dans l'ensemble du mésenchyme de la partie orale du bourgeon mandibulaire et leur expression marque la région où les dents se formeront (Fig. 11.61). Dlx2, Barx1, Lhx6 et Lhx7 sont exprimés dans les cellules mésenchymateuses qui formeront les molaires, cependant que *Msx1*, *Msx2*, *Lhx6* et *Lhx7* sont exprimés dans les cellules qui formeront les incisives. L'importance de ces facteurs de transcription dans la détermination de l'identité des dents a été montrée par des expériences dans lesquelles des billes recouvertes de l'antagoniste de BMP-4, Noggin, étaient placées dans des explants de la région



Fig. 11.61 Les domaines d'expression des gènes à homéoboîte dans la mâchoire inférieures avant la mise en place des germes dentaires. Illustration schématique d'une section des bourgeons mandibulaires fusionnés vue depuis l'arrière de la cavité orale. Les régions latérales des bourgeons donneront naissance aux régions proximales de la mâchoire inférieure, cependant que la région centrale donnera la région distale. Les expressions de Barx1 et de Dlx2 sont induites dans le mésenchyme latéral par la signalisation FGF issue de l'épithélium qui le recouvre et sont restreintes à cette région par la signalisation inhibitrice BMP de l'ectoderme oral distal. Les expressions de Msx1 et Msx2 dans le mésenchyme central sont induites par la signalisation BMP provenant de l'épithélium qui le recouvre. Lhx6 et Lhx7 sont exprimés dans tout le mésenchyme de la partie orale de l'ébauche mandibulaire. *Islet1* est exprimé dans la partie centrale de l'épithélium oral. Les expressions de Islet1 et de Bmp4 se maintiennent par des interactions mutuelles positives. Les cercles en pointillés indiquent les sites où se développeront les incisives et les molaires. Les codes liés aux gènes à homéoboîte sont respectivement pour les incisives Msx1, Msx2, Lhx6 et Lhx7, et pour les molaires Barx1, Dlx2, Lhx6 et Lhx7. Les flèches indiquent une signalisation positive, et les traits barrés une signalisation inhibitrice.

présomptive des incisives du bourgeon mandibulaire de souris. Il en a résulté la perte de l'expression de *Msx1* et la promotion de celle de *Barx1* et ultérieurement au cours de la culture, s'est développée une molaire à la place d'une incisive. Les souris mutantes dépourvues à la fois de *Dlx2* et *Dlx1* (gène similaire à *Dlx2* auquel il peut se substituer au cours du développement et qui est aussi exprimé dans le mésenchyme facial), ne développent pas de molaires dans la mâchoire supérieure, alors que les incisives ne sont pas affectées.

Le développement dentaire précoce est contrôlé par des interactions réciproques entre l'épithélium stomodéal et le mésenchyme sous-jacent. Comme pour les membres, sont impliquées les mêmes familles de molécules de signalisation, Wnt, TGF- β , FGF et Hh. *Shh* est exprimé dans la lame dentaire et plus tard se restreint aux bourgeons dentaires où la protéine Shh agit comme un mitogène induisant une prolifération locale de l'épithélium. Beaucoup de ligands Wnt sont aussi produits dans l'épithélium stomodéal et la signalisation Wnt est essentielle pour la formation des bourgeons dentaires. Ceux-ci ne se forment pas chez les souris mutantes surexprimant le gène *Dkk1*, qui code un antagoniste de Wnt, alors que l'activation de la signalisation Wnt peut induire un surplus de bourgeons dans la lame dentaire, bourgeons qui se développeront ensuite en dents surnuméraires. Les signaux BMP-4 et FGF-8 émis par l'épithélium stomodéal induisent des expressions, dépendantes de la position dans le mésenchyme facial, de gènes codant des facteurs de transcription, ainsi que l'expression de gènes codant des molécules de signalisation incluant BMP-4, activine, divers FGF et divers Wnt. À ce stade, la direction du signal change et fait que les signaux émis par le mésenchyme dirigent le développement de l'épithélium et conduisent à la formation de la gelée de l'émail qui contrôle la morphogenèse dentaire en produisant des signaux incluant des molécules de type FGF, Wnt et BMP. Les protéines FGF stimulent la prolifération de l'épithélium voisin alors que les cellules de la gelée de l'émail ne prolifèrent pas, ce qui modèle la forme de la dent en développement.

RÉSUMÉ

Beaucoup d'organes internes, tels que les poumons ou les vaisseaux sanguins, sont formés par des structures épithéliales tubulaires. Celles-ci peuvent être formées de novo par deux mécanismes de base : par l'invagination et le bourgeonnement d'un épithélium pré-existant, comme pour les trachées de la drosophile ou le poumon des vertébrés, ou par l'agrégation de cellules mésenchymateuses qui constituent un épithélium tubulaire, comme c'est le cas pour la formation initiale des vaisseaux sanguins. La ramification du système trachéen de la drosophile et des conduits respiratoires du poumon des vertébrés est contrôlée par des signaux conservés émis par le mésenchyme environnant. Le système vasculaire des vertébrés se développe à partir de cellules mésenchymateuses endothéliales qui s'assemblent lors de la vasculogenèse en structures épithéliales tubulaires qui sont les précurseurs des gros vaisseaux sanguins. Les tubules ensuite grandissent et se ramifient en fins vaisseaux pendant le processus de l'angiogenèse. Le cœur des vertébrés est au départ un tube linéaire constitué en interne d'endocarde et extérieurement de myocarde. Son développement est contrôlé par des gènes homologues de ceux qui régulent la formation du cœur de la drosophile. Les dents se développent à partir de bourgeons de l'épithélium oral et du mésenchyme sous-jacent dérivé des crêtes neurales. L'identité dentaire est spécifiée dans le mésenchyme par un code de gènes à homéoboîte et le développement est ensuite contrôlé par des signaux réciproques entre épithélium et mésenchyme.

Résumé du Chapitre 11

- Chez les embryons de vertébrés, la position dans laquelle les organes se forment, est spécifiée lors de la mise en place du plan d'organisation du corps. Ainsi, un code combinatoire Hox dans le mésoderme des lames latérales détermine la position des membres et un code combinatoire de gènes à homéoboîte dans les crêtes neurales à l'origine de la face détermine la position des dents.
- Chez la drosophile, les appendices adultes se développent à partir de disques imaginaux formés dans l'embryon et le segment dans lequel le disque se forme conditionne l'identité de l'appendice formé. L'identité du segment est déterminée par l'expression de gènes Hox et, à l'intérieur d'un segment, les disques correspondant à différentes structures (pattes et ailes par exemple) sont distingués par la présence d'ensembles différents de facteurs de transcription.
- L'identité de certains organes est contrôlée par des gènes « sélecteurs » ou « maîtres », et/ou des combinaisons spécifiques de facteurs de transcription et d'autres protéines qui activent un réseau de régulation génétique responsable du développement de l'organe. vestigial, par exemple, qui code un co-activateur transcriptionnel, est le « gène-maître » du développement de l'aile chez la drosophile, et *Pax6*, qui code un facteur de transcription, celui du développement de l'œil chez les vertébrés et la drosophile.
- Il y a un niveau de conservation remarquable dans les facteurs de transcription impliqués dans le développement d'organes particuliers chez les vertébrés et la drosophile. Le facteur de transcription codé par le gène Nkx2.5 chez les vertébrés et son homologue tin-man chez la drosophile sont ainsi requis pour la formation du cœur.
- Les principaux processus impliqués dans l'organogenèse sont les mêmes que ceux utilisés dans la mise en place du plan d'organisation, mais ils opèrent à l'intérieur d'une ébauche d'organe ou d'un disque imaginal (par exemple les bourgeons de membre, les disques

imaginaux d'aile et de patte, les germes dentaires et la cupule optique) de manière plus ou moins autonome, sans référence au reste de l'embryon.

- Le développement des organes chez les vertébrés nécessite l'intégration de cellules d'origines différentes. Par exemple, les membres sont composés de cellules issues du mésoderme des lames latérales, de l'ectoderme et des somites ; l'œil intègre des cellules ectodermiques neurales et non neurales, ainsi qu'une contribution des crêtes neurales céphaliques ; le poumon est composé d'endoderme et de mésoderme ; le cœur contient des cellules des lames latérales et des crêtes neurales ; les dents dérivent de l'ectoderme et des crêtes neurales.
- Chez les insectes, certaines structures intègrent aussi des cellules de diverses origines, mais cela est fait d'une manière plus modulaire. Un disque imaginal, par exemple, est une structure au développement autonome, avec les cellules à l'origine des muscles et des organes sensoriels, intégrées au disque depuis le tout début de sa formation et se développant au sein du disque.
- Les organes acquièrent également une innervation nerveuse et généralement une vascularisation (une association avec le système trachéal dans le cas de la drosophile).
- Des interactions cellulaires entre différents types de cellules, principalement mésenchymateuses et épithéliales, jouent des rôles clés dans le développement des organes. Chez les vertébrés, l'ectoderme du bourgeon de membre impose une organisation dorso-ventrale au mésoderme, et le mésenchyme des poumons influence les ramifications de l'épithélium pulmonaire. Dans l'œil, des interactions entre les différents épithéliums induisent la formation du cristallin.
- La formation des organes implique l'interprétation d'informations positionnelles. Des centres de signalisation se mettent en place dans les ébauches d'organes et produisent des morphogènes qui spécifient les valeurs de position. Des exemples de centres de signalisation sont la zone à activité polarisante dans les membres des vertébrés ou les frontières entre compartiments dans les disques imaginaux chez la drosophile.
- Les mêmes familles de molécules de signalisation agissent comme morphogènes dans divers organes, les différences d'interprétation venant de l'historique des cellules qui répondent. Par exemple, la signalisation Shh est impliquée dans le développement des membres, des yeux, des poumons et des dents chez les vertébrés. La signalisation Hh agit dans le développement des ailes et des yeux chez la drosophile.
- La différenciation cellulaire génère des cellules spécialisées pour assurer les fonctions spécifiques des organes. Les mêmes types cellulaires peuvent être produits à partir de cellules d'origines différentes (par exemple les os des membres sont d'origine mésodermique alors que ceux du crâne dérivent des crêtes neurales) ou un type cellulaire unique peut se différencier dans un organe particulier (les photorécepteurs de l'œil).
- La morphogenèse des organes implique les mêmes mécanismes utilisés lors de la mise en place du plan d'organisation du corps, par exemple des mouvements et des divisions cellulaires orientés (dans le membre) ou le repliement de couches cellulaires (dans l'œil).
- Un processus supplémentaire s'exprimant lors de l'organogenèse est la morphogenèse de structures ramifiées, illustrée dans ce chapitre par le poumon, le système vasculaire et le système trachéen chez la drosophile. Ces processus sont contrôlés par les mêmes signaux dans le poumon des vertébrés et les trachées de la drosophile.
- Les organes ont des capacités remarquables d'auto-organisation (les doigts ou la vésicule optique, par exemple).
- Des mécanismes de réaction-diffusion pourraient être impliqués dans la génération de patrons périodiques (doigts, ramifications pulmonaires).
- Des mutations dans des gènes importants pour le développement des organes peuvent conduire à des malformations congénitales dans l'espèce humaine. Ces malformations peuvent aussi être causées par l'exposition à des agents environnementaux qui agissent comme des tératogènes (par exemple la thalidomide) à des périodes critiques de l'organogenèse.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Décrire une expérience qui montre que les protéines FGF jouent un rôle crucial dans l'initiation de la formation du bourgeon de membre. Qu'est-ce qui provoque l'expression des gènes *Fgf* ? Proposer un réseau linéaire d'expression génique partant de l'expression des gènes Hox jusqu'à la formation du bourgeon de membre.

2. Décrire la localisation et l'étendue de la crête ectodermique apicale (AER) en relation avec les trois axes du membre.

3. Quelle est la conséquence du retrait de l'AER à différents moments de la formation du membre ? Comment interpréter ces résultats ? Donner des arguments en faveur de l'interprétation donnée.

4. Décrire la relation proposée entre les signalisations FGF et de l'acide rétinoïque dans la spécification d'identités le long de l'axe proximo-distal du membre en développement.

5. Où se situe dans le bourgeon de membre la zone à activité polarisante (ZPA) ? Quelles propriétés de cette région font d'elle un centre organisateur (voir Fig. 11.14) ? Par quelle molécule de signalisation les effets de la ZPA sont-ils exercés ? Quels sont les arguments en faveur de l'importance de cette molécule ?

6. Qu'est-ce que Gli3 ? Quel est son rôle dans la spécification de l'identité des doigts et par quels gènes cibles semble-t-il exercer son rôle ?

7. Quelle est la conséquence de la greffe de l'ectoderme d'un bourgeon de membre gauche sur la partie mésodermique d'un bourgeon droit, de telle manière que l'axe dorso-ventral soit inversé sans modifier l'axe antéro-postérieur ? Que peut-on conclure de cette expérience ? Quels sont les rôles de Wnt et Engrailed dans ce processus et comment le sait-on ?

8. Quels sont les signaux émis par l'ectoderme dorsal et l'AER qui sont requis pour le maintien de l'expression de Shh dans la ZPA ? Comment Shh maintient-il la signalisation de l'AER ?

9. Quelle est l'origine des cellules musculaires du membre ? Quels sont les arguments qui suggèrent que le mésenchyme du membre contrôle la disposition correcte des muscles dans le membre ?

10. Comment l'identité des différents disques imaginaux est-elle établie dans l'embryon de drosophile ? Comment se détermine qu'un disque formera une patte, une aile ou autre chose ? Comment l'expression ectopique d'*Antennapedia* dans la région de la tête peut-elle illustrer cela ?

11. Le gène *engrailed* est exprimé dans le compartiment postérieur du disque d'aile dans la larve et dans le compartiment postérieur des segments de l'embryon. Comparer et confronter les signaux qui sont en aval de l'expression d'*engrailed* dans ces deux situations (se référer au Chapitre 2 pour les informations concernant la segmentation).

12. Des mutations des gènes *wingless, apterous* et *vestigial* peuvent conduire à une réduction ou une absence des ailes chez la drosophile. En se basant sur le rôle de ces gènes dans les disques d'aile, proposer des mécanismes par lesquels ces mutations altèrent le développement des ailes.

13. Quel type de protéine est codé par le gène *Pax6* ? Discuter son rôle dans le développement de l'œil. Quelle est l'anomalie qui résulte de défauts dans l'expression ou la fonction de *Pax6* dans l'espèce humaine ?

14. Décrire les événements dans le développement qui conduisent à la formation du cristallin dans l'œil des embryons de vertébrés. Comment les expériences menées chez *Astyanax* ont-elles contribué à la compréhension de l'importance du cristallin dans le développement de l'œil ?

15. Quel est le rôle de la signalisation par le récepteur EGF, DER, dans le développement des ommatidies chez la drosophile ?

16. Résumer les processus généraux impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins chez les vertébrés et préciser le rôle de VEGF dans cette formation ?

17. Comment les trois couches cellulaires du cœur se forment-elles ? Inclure endocarde, myocarde et épicarde dans la réponse. Quelle est l'importance des interactions entre cellules de l'épicarde et du myocarde ?

18. Les dents forment un patron répété. Qu'est-ce qui assure que le type approprié de dents se forme à la position correcte dans la mâchoire ? Prendre comme exemple la formation des incisives et des molaires chez la souris.

QCM

NB. Il n'y a qu'une seule réponse correcte à chaque question

1. Le cartilage (à l'origine de l'os) et le tissu conjonctif du membre des vertébrés proviennent

- a) de cellules mésodermiques qui migrent dans le bourgeon de membre à partir des somites
- b) du mésenchyme mésodermique du bourgeon de membre
- c) de la crête apicale ectodermique
- d) de la zone de détermination progressive

2. L'ablation de la crête apicale ectodermique du bourgeon de membre provoque

- a) la poursuite du développement des structures proximales et l'arrêt de la formation de nouvelles structures distales
- b) la dégénérescence du bourgeon de membre
- c) la régénération d'une nouvelle crête apicale ectodermique à partir de l'épiderme adjacent
- d) la régénération d'un bourgeon de membre entier à partir du mésoderme sous-jacent

3. La greffe d'une seconde zone à activité polarisante dans la partie antérieure d'un bourgeon de membre conduit à

- a) la formation de doigts additionnels formant une duplication en miroir des doigts normaux
- b) la formation d'un second bourgeon de membre à l'endroit de la greffe
- c) la formation de nouveaux doigts qui n'ont aucune identité spécifique
- d) la formation de nouveaux doigts mais uniquement ceux avec une identité antérieure

4. La mort cellulaire programmée qui sépare les doigts est dépendante de quelle voie de signalisation ?

- a) BMP
- b) FGF
- c) Shh
- d) Wnt

5. Le gène *apterous* de la drosophile appartient à la même famille génique que *Lmx1b* de la souris et ces deux gènes sont impliqués dans

- a) le contrôle de la segmentation le long de l'axe antéro-postérieur
- b) le contrôle de la formation des ailes
- c) la spécification de l'identité dorsale de l'appendice dans lequel ils sont exprimés
- d) la spécification des structures formées par un segment donné

6. La formation des ocelles colorés sur les ailes des papillons dépend de l'expression de _____ dans le disque d'aile, qui n'est pas exprimé dans celui de drosophile.

- a) Distal-less
- b) Engrailed
- c) Hedgehog
- d) Wingless

7. L'expression ectopique du gène *Pax6* de souris dans le disque de patte de la drosophile

- a) n'a pas d'effet car les gènes de souris ne peuvent pas fonctionner chez la drosophile
- b) peut provoquer la formation d'yeux de souris sur la patte
- c) transforme le disque de patte en disque d'aile
- d) peut provoquer la formation d'yeux de drosophile sur la patte

8. Des inhibiteurs pharmacologiques qui bloquent VEGF sont utilisés pour

- a) corriger certaines malformations congénitales
- b) empêcher le développement des membres chez la souris
- c) étudier le développement de l'œil chez la drosophile
- d) traiter certains cancers
- 9. Le cœur se développe à partir
- a) de l'endoderme du tube digestif antérieur
- b) d'invaginations de l'épithélium ectodermique
- c) du mésoderme des lames latérales
- d) d'angioblastes mésodermiques

10. Le type de dents qui va se former dans différentes régions de la mâchoire est contrôlé par

- a) l'expression de BMP
- b) l'expression de gènes à homéoboîte
- c) une inhibition latérale
- d) l'organisation préalable du mésoderme

Réponses aux QCM

1 : b, 2 : a, 3 : a, 4 : a, 5 : c, 6 : a, 7 : d, 8 : d, 9 : c, 10 : b.

Références bibliographiques

11.1 Le membre des vertébrés se forme à partir d'un bourgeon de membre

- Delaurier, A., Burton, N., Bennett, M., Baldock, R., Davidson, D., Mohun, T.J., Logan, M.P. : **The Mouse Limb Anatomy Atlas : an interactive 3D tool for studying embryonic limb patterning**. *BMC Dev. Biol*. 2008, **8** : 83–89.
- Tickle, C. : The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mech. Dev.* 2004, **121** : 1019–1029.

11.2 La position et l'identité axiale des membres sont définies par l'activité de gènes exprimés dans le mésoderme des lames latérales

Altabef, M., Clarke, J.D.W., Tickle, C. : Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* 1997, **124** : 4547–4556.

- DeLaurier, A., Schweitzer, R., Logan M. : **Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb**. *Dev Biol* 2006, **299 :** 22–34.
- Duboc, V., Logan, M.P. : **Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology**. *Dev Dyn* 2011, **240** : 1017–1027.
- Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez Esteban, C., Izpisua Belmonte, J.C. : WNT signals control FGFdependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 2001, **104** : 891–900.

Nishimoto, S., Minguillon, C., Wood, S., Logan, M.P. : A combination of activation and repression by a colinear Hox code controls forelimb-restricted expression of Tbx5 and reveals Hox protein specificity. *PLoS Genet*. 2014, **10** : e1004245.

- Minguillon, C., Buono, J.D., Logan, M.P. : *Tbx5* and *Tbx4* are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev. Cell* 2005, 8 : 75–84.
- Minguillon, C., Nishimoto, S., Wood, S., Vendrell, E., Gibson-Brown, J.J., Logan, M.P. : Hox genes regulate onset of Tbx expression in the forelimb region. *Development* 2012, 139 : 3180–3189.

11.3 La crête apicale ectodermique est requise pour la croissance du membre et la formation des différentes structures le long de son axe proximal-distal

Fernandez-Teran, M., Ros, M.A. : The apical ectodermal ridge : morphological aspects and signaling pathways. Int. J. Dev. Biol. 2008, 52 : 857–871.

- Mariani, F.V., Ahn, C.P., Martin, G.R. : Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* 2008, **453** : 401–405.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., Martin, G.R. : **FGF-4** replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 1993, **75** : 579–587.

11.4 La croissance du bourgeon de membre fait appel à des comportements cellulaires orientés

- Bénazéraf, B., Francois, P., Baker, R.E., Denans, N., Little, C.D., Pourquié, O. : A random cell motility gradient downstream of FGF controls elongation of an amniote embryo. *Nature* 2010, 466 : 248–252.
- Boehm, B., Westerberg H., Lesnicar-Pucko, G., Raja, S., Rautschka, M., Cotterell, J., Swoger, J., Sharpe, J. : The role of spatially controlled cell proliferation in limb bud morphogenesis. *PLoS Biol* 2010, 8 : 8e1000420.
- Gros, J., Hu, J.K., Vinegoni, C., Feruglio, P.F., Weissleder, R., Tabin, C.J. : Wnt5a/Jnk and FGF/Mapk pathways regulate the cellular events shaping the vertebrate limb. *Curr. Biol.* 2010, 20 : 1993–2002.
- Gros, J., Tabin C.J. : Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science* 2014, **343** : 1253–1256.
- Wyngaarden, L.A., Vogeli, K.M., Ciruna, B.G., Wells, M., Hadjantonakis, A.K., Hopyan, S. : Oriented cell motility and division underlie early limb bud morphogenesis. *Development* 2010, 137 : 2551–2558.

11.5 La mise en place de l'organisation du bourgeon de membre fait appel à de l'information de position

Niswander, L. : **Pattern formation : old models out on a limb**. *Nat. Rev. Genet.* 2003, **4 :** 133–143.

Towers, M., Tickle, C. : Growing models of vertebrate limb development. *Development* 2009, **136** : 179–190.

11.6 Comment la position le long de l'axe proximo-distal du bourgeon de membre est spécifiée reste une question ouverte

- Cooper, K.L., Hu, J.K., ten Berge, D., Fernandez-Teran, M., Ros, M.A., Tabin, C.J. : Initiation of proximo-distal patterning in the vertebrate limb by signals and growth. *Science* 2011, **332** : 1083–1086.
- Galloway, J.L., Delgado, I., Ros, M.A., Tabin, C.J. : A reevaluation of X-irradiation-induced phocomelia and proximodistal limb patterning. *Nature* 2009, **460** : 400–404.
- Rosello-Diez A, Ros MA, Torres M. : Diffusible signals not autonomous mechanisms determine the main proximodistal limb subdivision. *Science* 2011, **332** : 1086–1088.
- Summerbell, D., Lewis, J.H., Wolpert, L. : **Positional information in chick limb morphogenesis**. *Nature* 1973, **244** : 492–496.
- Tabin, C., Wolpert, L. : **Rethinking the proximodistal axis of the** vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev.* 2007, 21 : 1433–1442.
- Wolpert, L., Tickle, C., Sampford, M. : The effect of cell killing by X-irradiation on pattern formation in the chick limb. J. Embryol. Exp. Morph. 1979, 50 : 175–193.
- Zeller, R., Lopez-Rios, J., Zuniga, A. : Vertebrate limb bud development : moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 2009, **10** : 845–858.

ENCART 11A Les effets des tératogènes sur le développement embryonnaire

- Brown, N. : **Chemical teratogens hazards, tools and clues**. In *Embryos, Genes and Birth Defects* 2nd edition (eds Ferretti, P., Copp, A., Tickle, C., Moore, G.) Wiley : 2006.
- Ferretti, P., Tickle, C. The limbs. In *Embryos, Genes and Birth Defects* 2nd edition (eds Ferretti, P., Copp, A., Tickle, C., Moore, G.) Wiley : 2006.
- Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., Handa, H. : Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 2010, **327** : 1345–1350.
- Tabin, C.J. : A developmental model for thalidomide defects. *Nature* 1998, **396 :** 322–323.
- Therapontos, C., Erskine, L., Gardner, E.R., Figg, W.D., Vargesson, N. : **Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation**. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009, **106** : 8573–8578.
- Vargesson, N. : Thalidomide embryopathy : an enigmatic challenge. *ISRN Dev. Biol.* 2013, Article ID 241016.

11.7 La zone à activité polarisante spécifie les positions le long de l'axe antéro-postérieur du membre

- Litingtung, Y., Dahn, R.D., Li, Y., Fallon, J.F., Chiang, C. : **Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity**. *Nature* 2002, **418** : 979–983.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., Tabin, C. : Sonic hedgehog mediates polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993, 75 : 1401–1416.
- te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H.J., Meijlink, F., Zeller, R. : **Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3**. *Science* 2002, **298** : 827–830.

- Tickle, C. : Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, **7**: 1–9.
- Towers, M., Mahood, R., Yin, Y., Tickle, C. : Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* 2008, **452 :** 882–886.

ENCART 11B Information de position et gradients de morphogènes

- Ashe, H.L., Briscoe, J. : The interpretation of morphogen gradients. *Development* 2006, 133 : 385–394.
- Kerszberg, M., Wolpert, L. : **Specifying positional information in the embryo : looking beyond morphogens**. *Cell* 2007, **130 :** 205–209.
- Kicheva, A., González-Gaitán, M. : The decapentaplegic morphogen gradient : a precise definition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008, 20 : 137–143.
- Müller, P., Rogers, K.W., Yu, S.R., Brand, M., Schier, A.F. : Morphogen transport. *Development* 2013, **140** : 1621–1638.
- Roy, S., Huang, H., Liu, S., Kornberg, T.B. : Cytonememediated contact-dependent transport of the Drosophila decapentaplegic signaling protein. Science 2014, 343 : 1244624.
- Sanders, T.A., Llagostera, E., Barna, M. : **Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning**. *Nature* 2013, **497 :** 628–632.

11.8 Sonic hedgehog est le morphogène produit par la zone à activité polarisante

- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., Tabin, C. : **Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA**. *Cell* 1993, **75** : 1401–1416.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P.T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A., Tickle, C. : Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 1997, 124 : 4393–4404.

ENCART 11C Des mutations qui affectent la formation de l'axe antéro-postérieur du membre peuvent causer des polydactylies

- Ahn, S., Joyner, A.L. : **Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning**. *Cell* 2004, **118 :** 505–516.
- Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P., Tabin, C.J. : Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 2004, 118 : 517–528.
- Hill, R.E., Lettice, L.A. : Alterations to the remote control of Shh gene expression cause congenital abnormalities. *Trans. R. Soc.* B 2013, 368 : 20120357.
- Lettice, L.A., Hill, A.E., Devenney, P.S., Hill, R.E. : Point mutations in a distant Shh cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly. *Hum. Mol. Genet.* 2008, **17** : 978–985.

ENCART 11D La signalisation Sonic hedgehog et le cil primaire

- Goetz S.C., Anderson, K.V. : The primary cilium : a signaling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* 2010, 11 : 331–344.
- Huangfu, D., Anderson, K.V. : Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102 : 11325–11330.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., Anderson, K.V. : **Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins**. *Nature* 2003, **426** : 83–87.

11.9 La manière dont l'identité des doigts est codée n'est pas connue

- Dahn, R.D., Fallon, J.F. : Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* 2000, **289 :** 438–441.
- Suzuki, T., Takeuchi, J., Koshiba-Takeuchi, K., Ogura, T. : *Tbx* genes specify posterior digit identity through Shh and BMP signaling. *Dev. Cell* 2004, **6**: 43–53.
- Suzuki, T., Hasso, S.M., Fallon, J.F. : Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, **105** : 4185–4190.
- Vokes, S.A., Ji, H., Wong, W.H., McMahon, A.P. : A genome-scale analysis of the *cis*-regulatory circuitry underlying Shhmediated patterning of the mammalian limb. *Genes Dev.* 2008, 22 : 2651–2663.

11.10 La mise en place de l'axe dorso-ventral du membre est contrôlée par l'ectoderme

- Arques, C.G., Doohan, R., Sharpe, J., Torres, M. : **Cell tracing reveals a dorsoventral lineage restriction plane in the mouse limb bud mesenchyme**. *Development* 2007, **134** : 3713–3722.
- Geduspan, J.S., MacCabe, J.A. : The ectodermal control of mesodermal patterns of differentiation in the developing chick wing. *Dev. Biol.* 1987, **124** : 398–408.
- Riddle, R.D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T.M., Tabin, C. : Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by *Wnt-7a* establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 1995, **83** : 631–640.

11.11 Le développement du membre nécessite des interactions entre les centres de signalisation

- Bénazet, J.D., Zeller, R. : Vertebrate limb development : moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb. Perspect.* 2009, 1 : a001339.
- Bénazet, J.D., Bischofberger, M., Tiecke, E., Gonçalves, A., Martin, J.F., Zuniga, A., Naef, F., Zeller, R. : A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* 2009, 323 : 1050–1053.
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G.R., Tickle, C. : A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 1994, **371** : 609–612.
- Pizette, S., Niswander, L. : **BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge**. *Development* 1999, **126 :** 883–894.
- Zeller, R., Lopez-Rios, J., Zuniga, A. : Vertebrate limb development : moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature Rev. Genet.* 2009, 10 : 845–855.

11.12 Des interprétations différentes de signaux de position identiques donnent naissance à des membres différents

- Logan, M. : Finger or toe : the molecular basis of limb identity. *Development* 2003, **130** : 6401–6410.
- Logan, M., Tabin, C.J. : Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* 1999, **283** : 1736–1739.

Saunders, J.W., Gasseling, M.T., Cairns, J.M. : The differentiation of prospective thigh mesoderm grafted beneath the apical ectodermal ridge of the wing bud in the chick embryo. *Dev. Biol.* 1959, 1 : 281–301.

11.13 Les gènes Hox interviennent à de multiples reprises dans le développement des membres

- Andrey, G., Montavon, T., Mascrez, B., Gonzalez, F., Noordermeer, D., Leleu, M., Trono, D., Spitz, F., Duboule D. : A switch between topological domains underlies HoxD genes collinearity in mouse limbs. *Science* 2013, 340: 1234167.
- Charité, J., De Graaff, W., Shen, S., Deschamps, J. : Ectopic expression of *Hoxb-8* causes duplication of the ZPA in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. *Cell* 1994, **78** : 589–601.
- Goodman, F.R. : Limb malformations and the human HOX genes. *Am. J. Med. Genet.* 2002, **112 :** 256–265.
- Kmita, M., Tarchini, B., Zàkàny, J., Logan, M., Tabin, C.J.,
 Duboule, D. : Early developmental arrest of mammalian
 limbs lacking *HoxA/HoxD* gene function. *Nature* 2005, 435 : 1113–1116.
- Montavon, T., Duboule, D. : Chromatin organization and global regulation of Hox gene clusters. *Phil. Trans R. Soc.* 2013, 368 : 20120367.
- Nelson, C.E., Morgan, B.A., Burke, A.C., Laufer, E., DiMambro, E., Muytaugh, L.C., Gonzales, E., Tessarollo, L., Parada, L.F., Tabin, C. : Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. Development 1996, 122 : 1449–1466.
- Wellik, D.M., Capecchi, M.R. : Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 2003, **301** : 363–367.
- Zakany, J., Kmita, M., Duboule, D. : A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* 2004, **304** : 1669–1672.
- Zakany, J., Duboule, D. : The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2007, **17**: 359–366.

11.14 L'auto-organisation pourrait être impliquée dans le développement du bourgeon de membre

Hardy, A., Richardson, M.K., Francis-West, P.N., Rodriguez,
C., Izpisúa-Belmonte, J.C., Duprez, D., Wolpert, L. : Gene expression, polarising activity and skeletal patterning in reaggregated hind limb mesenchyme. *Development* 1995, 121 : 4329–4337.

ENCART 11E Les mécanismes de réaction-diffusion

- Kondo, S., Miura, T. : Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. *Science* 2010, 329 : 1616–1620.
- Marcon, L., Sharpe, J. : **Turing patterns in development : what about the horse part ?** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012, **22 :** 578–584.
- Meinhardt, H. : **Turing's theory of morphogenesis of 1952 and the subsequent discovery of the crucial role of local self-enhancement and long-range inhibition**. *Interface Focus* 2012, **2 :** 407–416.
- Meinhardt, H., Gierer, A. : **Pattern formation by local self**activation and lateral inhibition. *BioEssays* 2000, 22 : 753–760.
- Miura, T., Shiota, K., Morriss-Kay, G., Maini, P.K. : Mixedmode pattern in Doublefoot mutant mouse limb—Turing

reaction-diffusion model on a growing domain during limb development. *J. Theor. Biol.* 2006, **240 :** 562–573.

Sheth, R., Marcon, L., Bastida, F.M., Junco, M., Quintana, L., Dahn, R., Kmita, M., Sharpe, J., Ros, M.A. : Hox genes regulate digit patterning by controlling the wavelength of a Turingtype mechanism. *Science* 2012, 338 : 1476–1480.

11.15 L'organisation de la musculature du membre est contrôlée par le tissu conjonctif

Amthor, H., Christ, B., Patel, K. : A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth—a balance between proliferation and differentiation. *Development* 1999, 126 : 1041–1053.

Anderson, C., Williams, V.C., Moyon, B., Daubas, P., Tajbakhsh, S., Buckingham, M.E., Shiroishi, T., Hughes, S.M., Borycki, A.G. : Sonic hedgehog acts cell-autonomously on muscle precursor cells to generate limb muscle diversity. *Genes Dev.* 2012, 26 : 2103–2117.

Hashimoto, K., Yokouchi, Y., Yamamoto, M., Kuroiwa, A. : **Distinct** signaling molecules control *Hoxa-11* and *Hoxa-13* expression in the muscle precursor and mesenchyme of the chick limb bud. *Development* 1999, **126** : 2771–2783.

Hu, J.K., McGlinn, E., Harfe, B.D., Kardon, G., Tabin, C.J. : Autonomous and nonautonomous roles of Hedgehog signaling in regulating limb muscle formation. *Genes Dev.* 2012, 26 : 2088–2102.

Robson, L.G., Kara, T., Crawley, A., Tickle, C. : **Tissue and** cellular patterning of the musculature in chick wings. *Development* 1994, **120** : 1265–1276.

Schweiger, H., Johnson, R.L., Brand-Sabin, B. : Characterization of migration behaviour of myogenic precursor cells in the limb bud with respect to Lmx1b expression. Anat. Embryol. 2004, 208 : 7–18.

Shellswell, G.B., Wolpert, L. : The pattern of muscle and tendon development in the chick wing. In *Limb and Somite Morphogenesis* (eds Ede, D.A., Hinchliffe, J.R., Balls, M.) Cambridge : Cambridge University Press, 1977.

11.16 Le développement initial des cartilages, des muscles et des tendons est autonome

Kardon, G. : Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 1998, **125** : 4019–4032.

Ros, M.A., Rivero, F.B., Hinchliffe, J.R., Hurle, J.M. :
Immunohistological and ultrastructural study of the developing tendons of the avian foot. *Anat. Embryol.* 1995, 192: 483–496.

11.17 La formation des articulations nécessite des signaux sécrétés et des stimuli mécaniques

Hartmann, C., Tabin, C.J. : Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* 2001, 104 : 341–351.

Kahn, J., Shwartz, Y., Blitz, E., Krief, S., Sharir, A., Breitel, D.A., Rattenbach, R., Relaix, F., Maire, P., Rountree, R.B., Kingsley, D.M., Zelzer, E. : Muscle contraction is necessary to maintain joint progenitor cell fate. *Dev. Cell* 2009, 16 : 734–743.

Khan, I.M., Redman, S.N., Williams, R., Dowthwaite, G.P., Oldfield, S.F., Archer, C.W. : **The development of synovial joints**. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2007, **79** : 1–36. Koyama, E., Shibukawa, Y., Nagayama, M., Sugito, H., Young, B., Yuasa, T., Okabe, T., Ochiai, T., Kamiya, N., Rountree, R.B., Kingsley, D.M., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Pacifici, M. : A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. Dev Biol. 2008, 316 : 62–73.

11.18 La séparation des doigts résulte de morts cellulaires programmées

Garcia-Martinez, V., Macias, D., Gañan, Y., Garcia-Lobo, J.M., Francia, M.V., Fernandez-Teran, M.A., Hurle, J.M. : Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J. Cell. Sci.* 1993, **106** : 201–208.

Hernandez-Martinez, R., Covarrubias, L. : Interdigital cell death function and regulation : new insights on an old programmed cell death model. *Dev. Growth Diff.* 2011, **53** : 245–258.

Zuzarte-Luis, V., Hurle, J.M. : **Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb**. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2005, **16** : 261–269.

11.19 L'aile adulte émerge pendant la métamorphose après l'enroulement et l'évagination du disque imaginal d'aile

Morata, G. : How Drosophila appendages develop. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2001, 2: 89–97.

11.20 Un centre de signalisation situé à la frontière entre les compartiments antérieurs et postérieurs organise le développement de l'aile de la drosophile selon l'axe antéropostérieur

Crozatier, M., Glise, B., Vincent, A. : **Patterns in evolution : veins** of the *Drosophila* wing. *Trends Genet*. 2004, **20 :** 498–505.

Entchev, E.V., Schwabedissen, A., González-Gaitán, M. : Gradient formation of the TGF-β homolog Dpp. *Cell* 2000, 103 : 981–991.

Han, C., Belenkaya, T.Y., Wang, B., Lin, X. : *Drosophila* glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynaminindependent process. *Development* 2004, 131 : 601–611.

Kruse, K., Pantazis, P., Bollenbach, T., Julicher, F., González-Gáitan, M. : Dpp gradient formation by dynamin-dependent endocytosis : receptor trafficking and the diffusion model. Development 2004, 131 : 4843–4856.

Moser, M., Campbell, G. : Generating and interpreting the Brinker gradient in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* 2005, 286 : 647–658.

Muller, B., Hartmann, B., Pyrowolakis, G., Affolter, M., Basler, K. : Conversion of an extracellular Dpp/BMP morphogen gradient into an inverse transcriptional gradient. *Cell* 2003, **113** : 221–233.

Tabata, T. : **Genetics of morphogen gradients**. *Nature Rev. Genet*. 2001, **2** : 620–630.

11.21 Un centre de signalisation situé à la frontière entre les compartiments dorsaux et ventraux organise le développement de l'aile de la drosophile selon l'axe dorsoventral

Baeg, G.H., Selva, E.M., Goodman, R.M., Dasgupta, R., Perrimon,
N. : The Wingless morphogen gradient is established by
the cooperative action of Frizzled and heparan sulfate
proteoglycan receptors. *Dev. Biol.* 2004, 276: 89–100.

Bollenbach, T., Pantazis, P., Kicheva, A., Bökel, C., González-Gaitán, M., Jülicher, F. : Precision of the Dpp gradient. *Development*. 2008, 135 : 1137–1146.

Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S., Nakato, H. : Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* 2003, 130 : 1515–1522.

Hayward, P., Kalmar, T., Martinez Arias, A. : Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* 2008, **135** : 411–424.

Kicheva, A., González-Gaitán, M. : The Decapentaplegic morphogen gradient : a precise definition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008, 20 : 137–143.

Lawrence, P. : Morphogens : how big is the picture ? *Nat. Cell Biol* 2001, **3** : E151–E154.

Martinez Arias, A. : Wnts as morphogens ? The view from the wing of *Drosophila*. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2003, 4 : 321–325.

Milán, M., Cohen, S.M. : A re-evaluation of the contributions of Apterous and Notch to the dorsoventral lineage restriction boundary in the *Drosophila* wing. *Development* 2003, 130 : 553–562.

Piddini, E., Vincent, J.P. : Interpretation of the Wingless gradient requires signaling-induced self-inhibition. *Cell* 2009, 136 : 296–307.

Rauskolb, C., Correia, T., Irvine, K.D. : Fringe-dependent separation of dorsal and ventral cells in the *Drosophila* wing. *Nature* 1999, 401 : 476–480.

Zecca, M., Basler, K., Struhl, G. : Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* 1995, **121** : 2265–2278.

11.22 Le gène *vestigial* spécifie l'identité des ailes et contrôle leur croissance

Kim, J., Sebring, A., Esch, J.J., Kraus, M.E., Vorwerk, K., Magee, J., Carroll, S.B. : Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila vestigial* gene. *Nature* 1996, **382 :** 133–138.

Klein, T., Martinez Arias, A. : The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development* 1999, **126 :** 913–925.

11.23 Comment l'organisation de l'aile le long de l'axe proximo-distal est-elle établie reste une question ouverte

Klein, T., Martinez Arias, A. : Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in Drosophila. Dev. Biol. 1998, 194 : 196–212.

11.24 Le développement du disque de patte se fait de manière similaire à celui du disque d'aile, sauf en ce qui concerne l'axe proximo-distal.

- Emerald, B.S., Cohen, S.M. : Spatial and temporal regulation of the homeotic selector gene Antennapedia is required for the establishment of leg identity in Drosophila. Dev. Biol. 2004, 267 : 462–472.
- Estella, C., Voutev, R., Mann, R.S. : A dynamic network of morphogens and transcription factors patterns the fly leg. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2012, **98** : 173–198.

Galindo, M.I., Bishop, S., Greig, S., Couso, J.P. : Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science* 2002, 297 : 258–259.

Kojima, T. : The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis. *Dev. Growth Differ*. 2004, **46** : 115–129.

11.25 Les motifs colorés des papillons se forment grâce à des informations positionnelles supplémentaires

Brakefield, P.M., French, V. : **Butterfly wings : the evolution of development of colour patterns**. *BioEssays* 1999, **21 :** 391–401.

French, V., Brakefield, P.M. : **Pattern formation : a focus on Notch in butterfly spots**. *Curr. Biol.* 2004, **14 :** R663–R665.

11.26 Différents disques imaginaux peuvent avoir les mêmes valeurs de position

Carroll, S.B. : Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* 1995, **376** : 479–485.

Morata, G. : How Drosophila appendages develop. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2001, 2: 89–97.

Si Dong, P.D., Chu, J., Panganiban, G. : **Coexpression of the homeobox genes** *Distal-less* and *homothorax* determines *Drosophila* antennal identity. *Development* 2000, **127** : 209–216.

11.27 L'œil de vertébrés se développe essentiellement à partir du tube neural et de l'ectoderme de la tête

Adler, R., Canto-Soler V. : **Molecular mechanisms of optic vesicle development : complexities, ambiguities and controversies**. *Dev. Biol.* 2007, **305 :** 1–13.

Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., Sasai, Y. : **Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture**. *Nature* 2011, **427** : 51–56.

Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S.N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A., Guck, J. : Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007, 104 : 8287–8292.

Gehring, W.J. : New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. J. Hered. 2005, 96 : 171–184.

Heavner, W., Pevney, L. : **Eye development and retinogenesis**. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, **4** : a008391.

Jeffery, W.R. : **Evolution and development in the cavefish** *Astyanax. Curr. Top. Dev. Biol.* 2009, **86 :** 191–221.

Sasai, Y., Eiraku, M., Suga, H. : *In vitro* organogenesis in threedimensional self-organizing stem cells. *Development* 2012, 139: 4111–4121.

Streit, A. : The preplacodal region : an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int. J. Dev. Biol.* 2007, **51** : 447–461.

```
Takahashi, S., Asashima, M., Kurata, S., Gehring, W.J. :
Conservation of Pax6 function and upstream activation by
Notch signaling in eye development of frogs and flies. Proc.
Natl Acad. Sci. USA 2002, 99 : 2020–2025.
```

11.28 La mise en place de l'organisation de l'oeil chez la drosophile repose sur des interactions cellule-cellule

Baonza, A., Casci, T., Freeman, M. : A primary role for the epidermal growth factor receptor in ommatidial spacing in the *Drosophila* eye. *Curr. Biol.* 2001, **11** : 396–404.

- Chou, W.H., Huber, A., Bentrop, J., Schulz, S., Schwab, K.,
 Chadwell, L.V., Paulsen, R., Britt, S.G. : Patterning of the
 R7 and R8 photoreceptor cells of *Drosophila* : evidence for
 induced and default cell-fate specification. *Development* 1999,
 126 : 607–616.
- Frankfort, B.J., Mardon, G. : **R8 development in the** *Drosophila* eye : a paradigm for neural selection and differentiation. *Development* 2002, **129** : 1295–1306.
- Freeman, M. : Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development* 1997, **124** : 261–270.
- Sahin, H.B., Çelik A. : *Drosophila* eye development and photoreceptor specification. *eLS* 2013.
- Strutt, H., Strutt, D. : **Polarity determination in the** *Drosophila* **eye**. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999, **9 :** 442–446.
- Tomlinson, A., Struhl, G. : Delta/Notch and Boss/Sevenless signals act combinatorially to specify the *Drosophila* R7 photoreceptor. *Mol. Cell* 2001, 7 : 487–495.

11.29 Les poumons de vertébrés se développent par ramification de tubes épithéliaux.

- Metzger, R.J., Klein, O.D., Martin, G.R.Krasnow, M.A. : The branching program of mouse lung development. *Nature* 2008, 453 : 745–750.
- Morrisey, E.E., Hogan, B.L.M. : **Preparing for the first breath : genetic and cellular mechanisms in lung development**. *Dev. Cell* 2010, **18**: 8–23.
- Ochoa-Espinosa, A., Affolter, M. : Branching morphogenesis : from organs to cells and back. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, 4 : a008243.
- Pepicelli, C.V., Lewis, P.M., McMahon, A.P. : Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr. Biol.* 1998, 8 : 1083–1086.
- Sakakura, T., Nishizuka, Y., Dawe, C.J. : Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science* 1976, **194** : 1439–1441.

11.30 Le système trachéen de la drosophile est un exemple type de morphogenèse ramifiée

- Affolter, M., Caussinus, E. : **Branching morphogenesis in** *Drosophila : new insights into cell behaviour and organ architecture. Development* 2008, **135** : 2055–2064.
- Ribeiro, C., Neumann, M., Affolter, M. : Genetic control of cell intercalation during tracheal morphogenesis in *Drosophila*. *Cell* 2004, **14** : 2197–2207.

11.31 Le système sanguin se développe par vasculogenèse à laquelle succède une angiogenèse

- Carmeliet, P., Tessier-Lavigne, M. : Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005, 436 : 193–200.
- Coultas, L., Chawengsaksophak, K., Rossant, J. : Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 2005, 438: 937–945.

Geudens, I., Gerhardt, H. : Coordinating cell behavior during blood vessel formation. *Development* 2011, **138** : 4569–4583.

- Harvey, N.L., Oliver, G. : Choose your fate : artery, vein or lymphatic vessel ? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004, 14 : 499–505.
- Jain, R.K., Carmeliet, P. : **Snapshot : tumor angiogenesis**. *Cell* 2012, **149 :** 1408.e1.
- Larrivée, B., Freitas, C., Suchting, S., Brunet, I., Eichmann, A.: Guidance of vascular development : lessons from the nervous system. *Circ. Res.* 2009, **104** : 428–441.
- Reese, D.E., Hall, C.E., Mikawa, T. : Negative regulation of midline vascular development by the notochord. *Dev. Cell* 2004, 6: 699–708.
- Rossant, J., Hirashima, M. : Vascular development and patterning : making the right choices. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003, **13** : 408–412.
- Sato, Y., Poynter, G., Huss, D., Filla, M.B., Czirok, A., Rongish, B.J., Little, C.D., Fraser, S.E., Lansford, R. : Dynamic analysis of vascular morphogenesis using transgenic quail embryos. *PLoS One* 2010, 5 : e12674.
- Wang, H.U., Chen, Z.-F., Anderson, D.J. : Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998, 93 : 741–753.

11.32 Le développement du cœur des vertébrés implique la morphogenèse et la régionalisation d'un tube mésodermique.

Bruneau, B.G. : The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008, **451** : 943–948.

- Linask, K.K., Yu, X., Chen, Y., Han, M.D. : Directionality of heart looping : effects of Pitx2c misexpression on flectin asymmetry and midline structures. *Dev. Biol.* 2002, **246** : 407–417.
- Meilhac, S.M., Esner, M., Kelly, R.G., Nicolas, J.F., Buckingham, M.E. : The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev. Cell* 2004, 6 : 685–698.
- Perez-Pomares, J.M., de la Pompa J.L. : Signalling during epicardium and coronary vessel development. *Circ. Res.* 2011, 109 : 1429–1442.
- Ray, H.J., Niswander, L. : **Mechanisms of tissue fusion during development**. *Development* 2012, **139** : 1701–1711.
- Srivastava, D., Olson, E.N. : A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 2000, **407** : 221–226.
- Staudt, D., Stainier, D. : Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish. Annu. Rev. Genet. 2012, 46 : 397–418.
- Vincent, S.D., Buckingham, M.E. : How to make a heart : the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2010, **90 :** 1–41.
- Zaffran, S., Kelly, R.G. : New developments in the second heart field. *Differentiation* 2012, 84 : 17–24.
11.33 Le développement dentaire implique des interactions épithélio-mésenchymateuses et un code de gènes à homéoboîte spécifie l'identité dentaire

- Cobourne, M.T., Sharpe, P.T. : **Making up the numbers : the molecular control of mammalian dental formula**. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2010, **21 :** 314–324.
- Jernvall, J., Thesleff, I. : Tooth shape formation and tooth renewal : evolving with the same signals. *Development* 2012, 139 : 3487–3497.
- Jussila, M., Thesleff, I. : Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012, **4** : a008425.
- Mitsiadis, T.A., Angeli, I., James, C., Lendahl, U., Sharpe, P.T. : **Role of Islet1 in the patterning of murine dentition**. *Development* 2003, **130 :** 4451–4460.
- Tucker, A., Sharpe, P. : The cutting-edge of mammalian development : how the embryo makes teeth. *Nat. Rev. Genet.* 2004, 5 : 499–508.

12

Développement du système nerveux

- Spécification de l'identité cellulaire dans le système nerveux
- Formation et migration des neurones
- Navigation axonale
- Formation et raffinement des synapses



Fig. 12.1 Le système nerveux périphérique de l'embryon de souris à 11 jours de gestation. Les parties du système nerveux de l'embryon intact de souris à mi-gestation sont révélées par le marquage immunohistochimique d'un antigène panneural (en rouge) et l'expression d'un gène marqueur des neurones somato-moteurs (Hb9, en vert). Les ganglions crâniens sensoriels et la disposition segmentaire des nerfs spinaux sont particulièrement visibles.

Photographie aimablement communiquée par I. Lieberam and T. Jessell. Le système nerveux est le plus complexe des systèmes parmi les organes de l'embryon animal. Chez les mammifères, par exemple, des milliards de neurones développent un mode de connexions très organisées, générant les réseaux neuronaux qui sont la base du fonctionnement du cerveau et de l'ensemble du système nerveux. Plusieurs centaines de types de neurones diffèrent par leur identité et les connexions qu'ils établissent, même s'ils peuvent sembler tout à fait similaires. Comprendre les processus de développement qui façonnent le système nerveux, n'est pas simple, car ils impliquent la spécification, la différenciation, la morphogenèse et la migration des neurones. À partir de leur corps cellulaire les neurones émettent de longs processus qui doivent être guidés pour trouver leurs cibles. Le contexte est en plus compliqué par l'activité électrique des neurones, celle-ci pouvant affiner la configuration de leurs connexions.

Le système nerveux est le plus complexe des systèmes parmi les organes de l'embryon animal. Chez les mammifères, par exemple, des milliards de neurones développent un mode de connexions très organisées, générant les réseaux de neurones qui sont la base du fonctionnement du système nerveux. Le système nerveux est globalement divisé en **système nerveux central**, l'encéphale et la moelle épinière, et le **système nerveux périphérique**, les nerfs et les ganglions qui relient le reste du corps avec le système nerveux central (Fig. 12.1).

Les systèmes nerveux des vertébrés et non-vertébrés offrent tous un système de communication grâce à un réseau de cellules électriquement excitables, les **neu-rones**, de tailles, formes, et fonctions différentes (Fig. 12.2). Le système nerveux contient également des cellules nerveuses non neuronales collectivement nommées **glie** ou **cellules gliales**, qui ont une variété de rôles dont celui de fournir la gaine de myéline des neurones telles les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique et les oligodendrocytes dans le système nerveux central. Les neurones se connectent les uns aux autres et avec d'autres cellules cibles, telles que les muscles, par des jonctions spécialisées appelées **synapses**. Un neurone reçoit l'information d'autres neurones sur ses **dendrites** fortement ramifiées et, si les signaux sont suffisamment puissants pour activer le neurone, ils génèrent un nouveau signal électrique, un **influx nerveux** ou **potentiel d'action**, au niveau du **corps cellulaire**. Ce signal électrique est ensuite conduit le long de l'**axone** à la **terminaison axonale** ou terminaison nerveuse, qui établit une synapse avec les dendrites ou le corps

Fig. 12.2 Neurones de toutes formes et de toutes tailles. Schéma du haut : montage de types variés de neurones observés dans le lobe optique du cerveau d'oiseau. Dans le cerveau les connexions nerveuses sont bien plus nombreuses que celles indiquées ici. Schéma du bas : un neurone isolé comprend un corps cellulaire, petit et rond contenant le noyau, et à partir duquel émergent un axone unique et un « arbre » de dendrites bien plus ramifiées. Les signaux des autres neurones sont reçus au niveau des dendrites, traités et intégrés dans le corps cellulaire, et un signal sortant, l'influx nerveux, est généré et envoyé le long de l'axone. Les signaux et la communication des neurones seront détaillés à la fin de ce chapitre.

cellulaire d'un autre neurone ou à la surface d'une cellule musculaire. Certains neurones du système nerveux central contactent de cette manière jusqu'à 500 autres neurones.

Les dendrites et les terminaisons axonales des neurones peuvent être fortement ramifiées, et un seul neurone dans le système nerveux central peut recevoir des influx par des synapses dont le nombre peut s'élever jusqu'à 100 000. À la synapse, le signal électrique est converti en un signal chimique, sous la forme d'un neurotransmetteur chimique qui est libéré à partir de la terminaison axonale et agit sur les récepteurs de la membrane de la cellule cible en vis-à-vis, pour générer ou supprimer un signal électrique. Pour que le système nerveux fonctionne normalement, les neurones doivent être correctement connectés les uns aux autres. Une question clé dans le développement du système nerveux réside donc dans la façon dont les connexions s'établissent de manière spécifique entre les neurones. Le nombre de neurones dans le cerveau humain est généralement estimé à environ 100 milliards. Le nombre d'entre eux ayant des identités uniques ou similaires n'est pas connu.

Dans ce chapitre seront décrits des exemples du système nerveux central des non-vertébrés et vertébrés, ce qui pose la question d'un précurseur commun ou de l'origine évolutive indépendante de ces deux systèmes. Anatomiquement, un système nerveux central est un tissu nerveux spatialement délimité composé de neurones avec des fonctions spécialisées, reliés entre eux par des faisceaux d'axones très organisés. Le système nerveux central reçoit des influx sensoriels du corps, les traite, les intègre et produit des messages qui guident les comportements, comme le mouvement. Une telle organisation définit globalement le système nerveux central d'animaux aussi éloignés, en terme d'évolution, que les vers annélides et les mammifères, et contraste avec le système nerveux diffus, ou réseau nerveux, des cnidaires (hydre et anémones de mer), qui reçoit des influx sensoriels et élabore des messages sans intégration centrale.

Un aspect important du développement du système nerveux chez les vertébrés et non-vertébrés est la séparation précoce de l'ectoderme en une partie épidermique non neurale et une partie neurale, le neuroectoderme, qui donne lieu à la fois au système nerveux central et au système nerveux périphérique. Chez les bilatériens, animaux avec une symétrie bilatérale, le cerveau et les organes sensoriels associés se développent à l'avant de l'embryon, dans la région de la tête. Des similitudes peuvent être trouvées entre les systèmes nerveux centraux embryonnaires de non-vertébrés simples et ceux de vertébrés. Chez le ver annélide Platynereis, par exemple, le neuroectoderme se subdivise longitudinalement en des domaines de neurones progéniteurs qui se chevauchent partiellement et correspondent à des domaines similaires dans le tube neural de vertébrés, et donnent naissance à des types cellulaires similaires à ceux des vertébrés. Comme il sera abordé plus loin dans ce chapitre, les gènes qui façonnent le système nerveux central chez les vertébrés sont sensibles à la signalisation par des membres de la famille des protéines morphogénétiques osseuses (BMP, pour Bone Morphogenetic protein), ce qui est également le cas chez *Platynereis*. Ces observations suggèrent qu'une architecture de système nerveux central était déjà présente chez le dernier ancêtre commun des bilatériens, et soutiennent l'hypothèse d'une origine commune du système nerveux.

Malgré toute sa complexité, le système nerveux résulte du même type de processus de développement cellulaire que ceux impliqués dans le développement





des autres organes. Le processus global de développement du système nerveux peut être divisé en six grandes étapes : la régionalisation du neuroectoderme en cerveau, en sous-régions du cerveau et en moelle épinière ; la spécification de l'identité des cellules nerveuses ; la formation et la migration des neurones ; la croissance des axones vers leurs cibles, la formation des synapses avec les cellules cibles pouvant être d'autres neurones, des cellules musculaires ou glandulaires ; le raffinement des connexions synaptiques *via* l'élimination de branches axonales et la mort neuronale.

Certains aspects du développement du système nerveux des vertébrés ont déjà été examinés, dont l'induction neurale (Chapitres 4 et 5), la formation du tube neural (Chapitre 9), et la migration des cellules des crêtes neurales qui se différencient en neurones des ganglions rachidiens (Chapitre 9). Certains de ces événements vont être revus avec la spécification de l'identité neuronale. Mais tous les aspects du développement du système nerveux ne peuvent être couverts en un seul chapitre, et celui-ci sera consacré aux mécanismes qui régionalisent le système nerveux, contrôlent l'identité des neurones, et façonnent leurs connexions synaptiques.

Spécification de l'identité cellulaire dans le système nerveux

Le futur tissu neural, le neuroectoderme, se différencie du reste de l'ectoderme lors de l'organisation précoce des embryons de non-vertébrés et de vertébrés, comme décrit aux Chapitres 2, 4 et 5. Ce chapitre va débuter avec l'étape suivante du processus de génération d'un système nerveux : la subdivision du neuroectoderme en grandes régions, caractéristiques par leur taille et forme, et la production d'un éventail de types neuronaux. Il s'agira d'expliquer par exemple comment le cerveau se subdivise en cerveaux antérieur, moyen et postérieur, et ensuite, comment les centaines de types de neurones distincts présents dans toutes ces régions acquièrent leur propre identité et localisation par rapport à l'ensemble. La spécification est un processus de perfectionnement continu et progressif des précurseurs neuraux, du patron régional initial grossier à l'identité cellulaire finale, et est achevée avant qu'une cellule précurseur ne subisse sa dernière division cellulaire et ne produise un neurone post-mitotique.

12.1 La régionalisation initiale du cerveau des vertébrés implique des signaux d'organisateurs locaux

Les chapitres 4 et 5 ont abordé comment, au cours de l'induction neurale des vertébrés, le neuroectoderme acquiert une polarité antéro-postérieure, avec une région antérieure élargie devenant l'encéphale. L'encéphale en développement se divise ensuite en trois grandes régions, les **prosencéphale** (cerveau antérieur), **mésencéphale** (cerveau moyen) et **rhombencéphale** (cerveau postérieur), illustrés ici chez des embryons de poulet à 2 et 4,5 jours (Fig. 12.3). Le prosencéphale embryonnaire développe deux expansions latérales importantes, les ébauches des vésicules optiques, à partir desquelles se forment les yeux (voir Section 11.27).

Le prosencéphale embryonnaire donne naissance aux **pallium** et noyaux gris centraux (**télencéphale**), au **thalamus** et à l'**hypothalamus** (diencéphale). Le pallium des embryons de mammifères donne les couches externes des hémisphères cérébraux bilatéraux, le **cortex cérébral** où sont situés les centres de traitement les plus performants pour l'information sensorielle, le contrôle moteur, l'apprentissage et la mémoire. Le thalamus est un centre relais majeur qui distribue l'information sensorielle entrante à la région corticale appropriée, tandis que l'hypothalamus, lien entre le cerveau et le système endocrinien, contrôle la libération des hormones de l'hypophyse.

Le mésencéphale embryonnaire donne naissance au **tectum**, où siègent des centres d'intégration et des relais pour les signaux issus du (ou destinés au) rhombencéphale, et aussi pour les signaux des organes sensoriels, tels que l'œil et l'oreille. Le rhombencéphale se caractérise par une série de sept ou huit renflements transitoires, connus sous le nom de **rhombomères**, donnant naissance au **cervelet** (rhombomère 1), pont



(rhombomères 2 et 3), **bulbe rachidien**, et qui sont concernés par le contrôle des activités de base inconscientes du corps, comme la régulation du tonus musculaire et de la posture (par le cervelet), du rythme cardiaque, de la respiration et de la pression artérielle.

12.2 Les centres de signalisation locaux façonnent le cerveau le long de l'axe antéro-postérieur

Trois centres de signalisation locaux, ou **organisateurs locaux**, sont responsables, dans le cerveau en développement, de la spécification des grandes sous-régions du cerveau (voir Fig. 12.3). L'un, nommé **jonction mésencéphale/rhombencéphale** (JMR), est situé au niveau de l'isthme entre ces deux régions de l'encéphale, et régule l'organisation du mésencéphale postérieur (tectum) comme la partie antérieure du rhombencéphale (cervelet). Un autre, nommé *zona limitans intrathala-mica* (ZLI), situé dans le prosencéphale postérieur régule la formation du thalamus. Un troisième, dit **crête neurale antérieure** (CNA), immédiatement adjacent au prosencéphale dans sa partie la plus antérieure, est responsable de la formation télencéphalique. La JMR et la CNA sont des centres majeurs de signalisation dans le cerveau d'un embryon de poulet de 2 jours, toujours actifs chez l'embryon de 4,5 jours, alors que la ZLI est formée plus tard et agit comme centre de signalisation chez l'embryon de 4,5 jours.

Les propriétés de signalisation au niveau de la frontière mésencéphale/rhombencéphale ont d'abord été décrites lors d'expériences de greffe chez des embryons de poulet de 2 jours. Greffée dans le mésencéphale antérieur ou le prosencéphale postérieur, la région de l'isthme transforme le thalamus présomptif en tectum, alors que greffée dans le rhombencéphale postérieur, elle transforme le bulbe rachidien présomptif en cervelet. FGF-8 produit au niveau de l'isthme, est un bon candidat comme signal bidirectionnel contrôlant la régionalisation du mésencéphale postérieur et du rhombencéphale antérieur. L'expression induite de *Fgf8* dans le mésencéphale antérieur de poulet, par exemple, induit l'expression de gènes caractéristiques du mésencéphale postérieur. Le mutant du poisson-zèbre *acerebellar* a une mutation qui abolit presque complètement l'expression de *Fgf8*, et les poissons mutants sont dépourvus de cervelet et de son organisateur associé.

Fig. 12.3 Centres organisateurs locaux dans le cerveau de vertébré

en développement. Vues latérales du cerveau d'embryons de poulet de 2 jours (stade HH 13 ; à gauche) et de 4,5 jours (stade HH 24 ; à droite). Les trois centres organisateurs locaux, l'isthme à la jonction mésencéphale-rhombencéphale (JMR), la zona limitans intrathalamica (ZLI) dans la partie postérieure du prosencéphale, et la crête neurale antérieure (CNA) au pôle antérieur, sont repérés par des barres colorées. Des signalisations bidirectionnelles à partir de JMR et ZLI, et unidirectionnelle à partir de CNA (indiquées par des flèches noires) sont responsables du patron de régionalisation des régions cérébrales adjacentes, impliquant la sécrétion de FGF-8 (en rouge) à partir de JMR et CNA, et Sonic hedgehog (Shh, en vert) à partir de ZLI. Wnt-1 est aussi exprimé sur la bordure antérieure de JMR. La frontière entre l'expression de Otx2 dans le mésencéphale (en violet) et Gbx2 dans le rhombencéphale (en jaune) est liée à la formation du centre organisateur JMR. PrZLI, zona limitans intrathalamica présomptive.

D'après Kiecker, C., Lumsden, A. : Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. Nat. Rev. Neurosci. 2005, **6 :** 553-564.

Fig. 12.4 Régulation du patron cortical

par les signaux locaux. En haut : schéma en vue frontale du prosencéphale d'un embryon de souris à mi-parcours de la gestation, montrant les divers centres et leurs signaux : la crête neurale antérieure (CNA) et ses dérivés, la plaque commissurale dans la partie antérieure du prosencéphale (FGF, en rouge) ; le prosencéphale basal (Shh, en vert) ; la ligne médiane corticale (Wnt, en bleu). Au milieu, à gauche : vue supérieure de la source de FGF-8 dans le télencéphale antérieur ; au centre : les domaines d'expression graduée de trois facteurs de transcription importants, Emx2, Coup-tf1 et Pax6. En bas : en l'absence de l'un ou l'autre de ces facteurs, l'identité des aires corticales est altérée, montrant que le cortex visuel (V) dépend de Emx2 et Coup-tf1 alors que le cortex moteur (M) requiert Pax6. S, cortex somato-sensoriel.

En haut, d'après Sur, M., Rubenstein, J.L.R. : Patterning and plasticity of the cerebral cortex. Science 1973, **310** : 805-810.

Au milieu, d'après O'Leary, D., Nakagawa, Y. : **Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex**. Curr. Opin. Neurobiol. 2002, **12** : 14–25.

En bas, d'après Rakic, P., et al. : **Decision by division : making cortical maps**. Trends Neurosci. 2009, **32** : 291-301.



L'organisateur de la jonction mésencéphale/rhombencéphale se développe à la frontière entre les domaines d'expression des facteurs de transcription Otx2 (du côté du mésencéphale) et Gbx2 (du côté du rhombencéphale). L'un des premiers événements de régionalisation dans le développement du cerveau est produit dans la plaque neurale par la division initiale en un territoire antérieur exprimant Otx2 et un territoire postérieur exprimant Gbx2. Plus tard, dans le tube neural, FGF-8 est produit du côté rhombencéphalique de la frontière et la molécule de signalisation Wnt-1 sur son versant mésencéphalique. L'émission de signaux bidirectionnels *via* la molécule de signalisation Sonic hedgehog (Shh) par la *zona limitans intrathalamica* est essentielle pour la formation du pré-thalamus en avant et du thalamus en arrière (voir Fig. 12.3).

La fonction classique d'un organisateur local est de sécréter une molécule diffusible induisant l'expression de facteurs de transcription selon un arrangement spatial spécifique. Une même molécule, par exemple FGF-8, capable d'induire l'expression de gènes différents en des endroits distincts, est nommée morphogène (voir Encart 11B). Un morphogène confère une information de position : en diffusant à partir d'une source localisée et en formant un gradient de concentration dans les tissus environnants, le morphogène définit les limites d'un champ cérébral et induit l'expression de différents facteurs de transcription à des concentrations variées (Encart 11B). Ces facteurs codent la valeur de position d'une cellule et sont impliqués dans la traduction de cette valeur de position en identité finale de la cellule. L'application de ce principe sera vue lors de la comparaison des différentes réponses de la jonction mésencéphale/ rhombencéphale et du cortex cérébral au même morphogène, FGF-8.

12.3 Le cortex cérébral est façonné par des signaux de la crête neurale antérieure

Le cortex embryonnaire a longtemps été considéré comme une ardoise vierge, une « *tabula rasa* », avec son patron très complexe **d'aires fonctionnelles** imposées tardivement dans le développement, et surtout par l'organisation spatiale de l'arrivée des axones du thalamus. Cependant, il est clair maintenant que le précurseur du cortex, le pallium, acquiert une identité spatiale considérable beaucoup plus tôt dans le développement. Les gènes de nombreux facteurs de transcription, comme Emx2 (l'orthologue vertébré du gène de la tête de la mouche, *empty spiracles*), Pax6 (voir Section 11.27), Coup-tf1, et Lhx2, sont exprimés par différents sous-domaines anté-ro-postérieurs et médio-latéraux du pallium, sous le contrôle inductif de morpho-gènes tels que FGF-8 diffusant depuis la crête neurale antérieure, et des protéines Wnt depuis la ligne médiane (Fig. 12.4). Des mutants murins pour *Emx2*, *Pax6*, et *Coup-tf1* montrent comment ces facteurs de transcription régulent l'identité spatiale : la perte de Emx2 ou de Coup-tf1 résulte en l'expansion des aires antérieures, représentant les cortex moteur et somato-sensoriel, au détriment des aires corticales visuelles postérieures, tandis que la perte de Pax6 résulte en un changement inverse.

12.4 Le rhombencéphale est segmenté en rhombomères par des limites de restriction de lignage cellulaire

Le développement du rhombencéphale (et de la face et de la tête *via* des cellules des crêtes neurales émergeant du rhombencéphale), implique sa **segmentation** (ou métamérisation) suivant l'axe antéro-postérieur. Cette organisation particulière du système nerveux n'est observée ni pour le mésencéphale ou le prosencéphale, dont les patrons d'organisation sont contrôlés par des organisateurs locaux, ni pour la moelle épinière pour laquelle les distributions à intervalles réguliers des ganglions de la racine dorsale et des nerfs moteurs de la racine ventrale sont assujetties au nombre de somites (voir Section 9.16). Chez l'embryon de poulet, deux systèmes segmentés apparaissent dans la région de la tête postérieure à 3 jours de développement (Fig. 12.5), le rhomben-céphale divisé en huit rhombomères (r1 à r8), et ventralement au rhombencéphale, une série d'**arcs branchiaux** (b1 à b4) qui sont colonisés par des cellules des crêtes neurales migrant à partir du rhombencéphale. En plus de tissus cérébraux, les arcs branchiaux donnent naissance à des tissus de la tête et de la gorge. Une division similaire du rhombencéphale en rhombomères se produit chez tous les vertébrés modèles.

Le développement du rhombencéphale antérieur implique plusieurs composantes en interaction. Dans cette région le tube neural produit à la fois les nerfs moteurs crâniens métamérisés innervant la face et le cou (voir Fig. 12.5), et les cellules des crêtes neurales, à l'origine des ganglions crâniens sensoriels et parasympathiques, des cellules de Schwann des nerfs crâniens, de l'**ectomésenchyme** formant la majeure partie du squelette facial, et du tissu conjonctif. Les ganglions sensoriels reçoivent également une contribution des placodes, formées à partir de l'ectoderme superficiel. En outre, la vésicule otique, se développe en vis-à-vis des rhombomères 5 et 6, et formera l'oreille.

Les principaux éléments du squelette du visage se développent à partir des deux premiers arcs branchiaux. Le premier arc par exemple, donne naissance aux mâchoires (maxillaire et mandibule), à deux os de l'oreille moyenne, le marteau (*malleus*) et l'enclume (*incus*), tandis que le second arc donne l'os hyoïde et l'étrier (*stapes*) de l'oreille moyenne. Cette région de la tête est un modèle particulièrement intéressant pour l'étude de l'organisation de l'axe antéro-postérieur, car elle présente des structures nombreuses et variées régulièrement disposées selon cet axe.

Suite à la fermeture du tube neural chez l'embryon de poulet, le futur rhombencéphale se resserre transversalement et périodiquement pour former huit rhombomères (voir Fig. 12.5). Les mécanismes cellulaires responsables de ces constrictions ne sont pas complètement élucidés, mais impliquent vraisemblablement des hétérogénéités locales de forme et de division cellulaires. Les limites entre les rhombomères se distinguent ensuite du neuroépithélium adjacent, par une nette augmentation de l'espace extracellulaire à cet endroit. Des expériences de traçage de lignage cellulaire montrent qu'une fois formés, les rhombomères individuels sont des zones de restriction de lignage cellulaire, c'est-à-dire que les cellules et leurs descendants sont confinés à l'intérieur de leur rhombomère d'origine et n'en franchissent pas les limites. Suivre les descendants d'une cellule unique marquée, permet de montrer qu'avant l'apparition des constrictions, les descendants d'une cellule donnée peuvent former un clone qui enjambe les limites, alors qu'après l'apparition des constrictions, les clones de cellules marquées sont confinés à



Fig. 12.5 Système nerveux d'un embryon de poulet de 3 jours (stade HH 18). À ce stade de développement le rhombencéphale est divisé en huit rhombomères (r1 à r8). La position de trois des neuf nerfs crâniens qui émergent du rhombencéphale est repérée en vert ; b1 à b4 indiquant les quatre arcs branchiaux, b1 donnant les mâchoires ; s = somite.

Illustration adaptée avec l'autorisation de Lumsden, A. : **Cell lineage restrictions in the chick embryo hindbrain**. Phil. Trans. R. Soc. Lond. *B* 1991, **331** : 281-286.



un seul rhombomère (Fig. 12.6). Cette restriction clonale suggère que chaque rhombomère fonctionne comme une unité de développement indépendante. À cet égard, comme cela a été vu au Chapitre 2, un rhombomère se comporte plutôt comme un compartiment, ce qui est un trait important du développement des insectes, mais semble être rare chez les vertébrés (noter cependant les compartiments dorsal et ventral dans les bourgeons des membres, Section 11.10). Les rhombomères sont des boîtes de cellules compactes à l'intérieur desquelles les précurseurs neuronaux acquièrent leurs valeurs de position. Une fois devenus des neurones différenciés, ces précurseurs peuvent migrer tangentiellement loin de leur rhombomère d'origine. Les rhombomères disparaîtront ensuite, et ceci dès 4,5 jours environ chez l'embryon de poulet (voir Fig. 12.3).

La découverte de certaines propriétés d'adhérence des cellules de rhombomères impairs, non partagées par les cellules des rhombomères pairs, a fourni des indices sur la façon dont les cellules provenant de rhombomères adjacents ne se mélangent pas. Si deux rhombomères, l'un pair et l'autre impair non adjacents sont réunis, une nouvelle limite se forme entre eux. Par contre aucune nouvelle limite ne se forme lorsque deux rhombomères impairs sont réunis, ce qui suggère que leurs cellules sont compatibles les unes avec les autres. Il est peu probable que la région frontière elle-même agisse comme une barrière mécanique car les cellules de rhombomères adjacents ne se mélangent pas lorsqu'on enlève chirurgicalement leur région frontière. Certaines protéines de surface cellulaire de la famille des éphrines, et leurs récepteurs Eph, exprimés distinctement dans des rhombomères alternés pourraient être impliqués dans ce cloisonnement cellulaire.

Les éphrines et leurs récepteurs sont des protéines de signalisation membranaires interagissant les unes avec les autres sur des cellules adjacentes, et constituant des signaux vers leurs cellules respectives. Elles génèrent des interactions cellule-cellule répulsives ou attractives (voir Encart 9D). Le récepteur EphA4, en particulier, fortement exprimé dans les rhombomères r3 et r5, et son ligand l'éphrine B2 exprimé dans r2, r4 et r6, pourraient fournir des interactions répulsives à chaque limite de rhombomères et ainsi empêcher le mélange des cellules (voir Fig. 12.6). La production de EphA4 dans r3 et r5 est sous le contrôle du facteur de transcription Krox20, lui-même produit dans la plaque neurale en deux bandes qui deviendront r3 et r5. Des ensembles distincts de facteurs de transcription activent *Krox20* dans r3 et r5.

Fig. 12.6 Restriction des lignages dans les rhombomères du rhombencéphale embryonnaire de poulet. Des cellules précurseurs neurales isolées, marquées avec du dextran rhodamine, sont injectées à un stade précoce (à gauche) ou plus tardif (à droite) de la neurulation, et leurs descendants sont cartographiés deux jours plus tard (au milieu). Les cellules injectées avant la formation des limites des rhombomères donnent naissance à des clones chevauchant deux rhombomères (en rouge foncé) ou pas (en rouge). Les clones marqués après la formation des rhombomères ne franchissent pas les limites des rhombomères de leur origine (en bleu), bien que les neurones auxquels ils donneront naissance pourront le faire.

Ilustration adaptée avec l'autorisation de Lumsden, A. : Cell lineage restrictions in the chick embryo hindbrain. Phil. Trans. R. Soc. Lond, B 1991, 331 : 281-286.



La division du rhombencéphale en rhombomères a une autre signification fonctionnelle. Un patron similaire de types neuronaux apparaît le long de l'axe antéro-postérieur de chaque rhombomère, et au même moment, chaque rhombomère acquiert une identité unique en fonction des nerfs crâniens et des autres tissus qu'il formera. La délimitation et le développement futur des rhombomères individuels sont sous le contrôle de Hox et d'autres facteurs de transcription et, va être décrite la façon dont l'expression des gènes Hox fournit une information de position et d'identité, à la fois au rhombencéphale en développement et aux cellules des crêtes neurales qui en proviennent.

12.5 Les gènes Hox fournissent une information de position dans le rhombencéphale en développement

L'apparition des rhombomères est précédée par la mise en place du patron d'expression de gènes contrôlant la transcription, dont les gènes Hox et *Krox20*, qui divise d'abord le tube neural en segments rhombomériques présomptifs. L'expression des gènes Hox est en partie responsable de l'identité des rhombomères et des crêtes neurales en différents endroits du rhombencéphale. Aucun gène Hox n'est exprimé dans la partie la plus antérieure de la tête ou dans r1, mais les gènes Hox de quatre groupes paralogues (1, 2, 3, et 4) sont exprimés dans le reste du rhombencéphale de la souris selon un patron bien défini, en étroite corrélation avec le patron de segmentation (Fig. 12.7). À ce stade, le gène Hox exprimé le plus antérieurement (dans r2) est *Hoxa2*. En général, les différents groupes paralogues ont des limites d'expression antérieures distinctes. Par exemple, la limite antérieure de l'expression de *Hoxb2* est la frontière entre r2 et r3, alors que la limite antérieure de l'expression de *Hoxb3* est la frontière entre r4 et r5.

Des études moléculaires ont fourni des indications sur la façon dont l'expression des gènes Hox est contrôlée dans chaque rhombomère. Par exemple, le gène *Hoxb2* est exprimé dans trois rhombomères contigus r3, r4 et r5, mais son expression dans r3 et r5 est contrôlée indépendamment de celle de r4. La région régulatrice du gène *Hoxb2* porte deux modules *cis*-régulateurs distincts, dont l'un régule son expression dans r3 et r5, tandis que l'autre la contrôle dans r4. Dans r3 et r5, *Hoxb2* est activé en partie par le facteur de transcription Krox20, qui est exprimé dans ces deux rhombomères, mais pas dans r4 (voir Fig. 12.7). L'action de Krox20 requiert sa liaison avec des sites régulateurs de *Hoxb2*.

Dans le cas de *Hoxb4*, dont la limite antérieure d'expression est située entre r6 et r7, il semble que le gène soit activé par des signaux venant à la fois de l'intérieur du tube neural et des somites adjacents. L'un de ces signaux pourrait être l'acide rétinoïque, qui est produit par les somites et est impliqué dans l'organisation du rhombencéphale. L'absence d'acide rétinoïque entraîne une perte de rhombomères dans le rhombencéphale, alors qu'un excès provoque une transformation des neurones antérieurs en neurones postérieurs dans le rhombencéphale.

Fig. 12.7 Expression des gènes Hox dans le rhombencéphale. L'expression des gènes de trois complexes Hox paralogues est indiquée dans le rhombencéphale (rhombomères r1 à r8). Hoxa1 et Hoxd1 ne sont pas exprimés à ce stade. Remarquer l'absence d'expression des gènes Hox dans r1. La liste des gènes Hox dont l'expression antérieure débute dans chaque rhombomère apparaît en dessous. À l'exception de Hox1b dont l'expression est exclusivement limitée à r4, tous les gènes Hox cités sont également exprimés dans tous les rhombomères postérieurs depuis le niveau le plus antérieur de leur expression. Le gène codant le facteur de transcription Krox20 est exprimé dans les rhombomères 3 et 5.

Illustration d'après Krumlauf, R. : **Hox genes** and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. Trends Genet. 1993, **9** : 106-112. L'aptitude des gènes Hox à déterminer la destinée et le développement futur des cellules des rhombomères est révélée par des expériences modifiant leur expression. Chaque paire de rhombomères produit des axones moteurs se projetant dans un seul arc branchial : les axones des régions ventrale et pré-motrice des rhombomères r2/r3 dans le premier arc branchial, alors que ceux de r4/r5 se projettent dans le deuxième arc (voir Fig. 12.5). *Hoxb1* est normalement exprimé dans r4, mais pas dans r2. L'expression anormale de *Hoxb1* dans r2 s'accompagne de la projection des axones dans le deuxième arc. Cette dernière observation est un exemple supplémentaire de transformation homéotique produite par modification de l'expression des gènes Hox.

Les gènes Hox ne sont pas exprimés dans la partie la plus antérieure du tissu neural constituée du prosencéphale, du mésencéphale, et de r1 du rhombencéphale. D'autres facteurs de transcription à homéodomaine, tels que Otx et Emx, sont produits en avant du rhombencéphale, et spécifient le patron antéro-postérieur du prosencéphale. Comme vu plus haut, la limite postérieure de l'expression de *Otx2* délimite la jonction mésencéphale/rhombencéphale chez le poulet (voir Fig. 12.3). Le gène orthodenticle de la drosophile et ses homologues Otx, chez les vertébrés, fournissent un bon exemple de la conservation de la fonction des gènes au cours de l'évolution. orthoden*ticle* est exprimé dans la région postérieure du futur cerveau chez la drosophile, et des mutations de ce gène résultent en un cerveau fortement réduit. Chez les souris, Otx1 et Otx2 sont exprimés dans des domaines se chevauchant dans le prosencéphale et le mésencéphale, et une mutation touchant Otx1 conduit à des anomalies cérébrales et à l'épilepsie. Les souris ayant un gène Otx défectueux peuvent être partiellement rétablies en remplaçant celui-ci par orthodenticle, même si la similarité de séquence des deux protéines est confinée à la région de l'homéodomaine. Chez la drosophile, *Otx* humain peut aussi rétablir des mutants *orthodenticle*.

12.6 Le patron de différenciation cellulaire le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière dépend de signaux ventraux et dorsaux

La mise en place d'un patron grossier de spécification dans le cerveau en développement est le résultat de signaux issus d'organisateurs locaux activant des facteurs de transcription qui agissent alors comme déterminants régionaux ou sous-régionaux du devenir cellulaire. Le défi suivant auquel l'embryon doit répondre est d'assurer, à un niveau plus fin, la différenciation aux bons endroits du tube neural de neurones individuels, avec des types et fonctions particuliers. La moelle épinière en développement, avec sur toute sa longueur un patron dorso-ventral particulièrement bien défini de neurones fonctionnellement distincts (Fig. 12.8), est un système particulièrement adapté pour étudier à la fois les organisations grossière et fine du système nerveux.

Les futurs motoneurones formant les racines ventrales des nerfs rachidiens et leurs interneurones associés sont localisés dans la moelle ventrale, alors que les **neurones commissuraux**, les neurones sensoriels de deuxième ordre et leurs interneurones associés se différencient avant tout dorsalement. Chaque type cellulaire apparaît de façon symétrique de part et d'autre de la ligne médiane. Alors que les motoneurones et la plupart des neurones sensoriels se différenciant dans les moitiés droite et gauche de la moelle émettent des axones demeurant du même côté par rapport à leur origine, les axones des neurones commissuraux croiseront la ligne médiane, assurant un lien entre les deux côtés de la moelle épinière (Fig. 12.9). Les neurones sensoriels primaires se développent à partir des cellules des crêtes neurales localisées au niveau dorsal du tube neural et quittent latéralement la surface du tube pour former les ganglions des racines dorsales qui se disposent à intervalles réguliers de chaque côté de la moelle épinière (Fig. 12.9, 9.38 et 9.39).

Comment des signaux reçus par le tube neural précoce, et induisant la différenciation de certains types de neurones dans les positions correctes, assurent-ils l'organisation dorso-ventrale de la moelle épinière ? En plus des précurseurs des futures cellules nerveuses, deux groupes de cellules non neurales forment la **plaque du plancher** et la **plaque du toit**, le long de la ligne médiane ventrale et de la ligne médiane dorsale, respectivement. Ces deux régions produisent des signaux qui façonnent le tube neural le long de son axe dorso-ventral. La plaque du plancher est induite par des signaux sécrétés par la chorde mésodermique, qui se trouve immédiatement au-dessous du tube neural. L'activité organisatrice de la chorde à l'égard du tube neural peut être étudiée en greffant un segment de chorde en un site latéral ou dorsal du tube neural (voir Fig. 5.34, où le dispositif expérimental est décrit pour son effet sur la construction des somites). Une deuxième plaque du plancher est induite dans le tube neural en contact direct avec la chorde greffée. Des marqueurs moléculaires de différenciation de cellules dorsales sont supprimés dans les cellules neurales voisines, et des motoneurones supplémentaires sont générés, alors que normalement ils ne se développent que dans la région ventrale. Le marquage *in situ* de l'expression de gènes, et des expériences altérant leur expression ont permis d'identifier Shh comme signal inducteur sécrété par la chorde. Shh induit les cellules de la plaque du plancher à produire elles-mêmes Shh, ce qui forme ensuite un gradient d'activité ventro-dorsal dans le tube neural, et agit comme le signal d'organisation ventrale (Fig. 12.10).

La conversion dans le tube neural ventral des précurseurs neuronaux du neuroépithélium en cellules progénitrices engagées dans la voie motoneuronale est régie par Shh de la plaque du plancher et par l'acide rétinoïque sécrété par le mésoderme adjacent. Le contrôle de la prolifération des cellules progénitrices neurales par des signaux Wnt mitogènes est également important pour réguler le nombre de neurones produits. En lien avec leur rôle dans la différenciation neuronale *in vivo*, Shh et l'acide rétinoïque peuvent diriger en culture le développement des cellules souches embryonnaires en motoneurones et interneurones.

La plaque du toit est initialement spécifiée par des signaux issus de l'ectoderme épidermique dorsal, puis des signaux de la plaque du toit façonnent la moitié dorsale du tube neural. Des *knock-outs* génétiques et la cartographie des destinées cellulaires, ont permis de montrer que l'ablation sélective de la plaque du toit à partir du tube neural d'embryon de souris conduit à la perte des interneurones les plus dorsaux. Le signal de dorsalisation comprend plusieurs membres de la famille des BMP. Les BMP de l'ectoderme (voir Chapitre 5) spécifient la plaque du toit, et ceux produits ensuite par la plaque du toit façonnent la région dorsale du tube neural. Les signaux BMP semblent assurer une différenciation dorsale en s'opposant à l'action de signaux issus de la région ventrale, l'ensemble organisant le patron de l'axe dorso-ventral du tube neural (Fig. 12.10).



Fig. 12.8 Organisation dorso-ventrale du tube neural spinal embryonnaire. Dans le tube neural se développant en moelle épinière, deux plaques de cellules non neurales apparaissent le long de la ligne médiane, la plaque du plancher, ventralement, et la plaque du toit, dorsalement. Les neurones commissuraux (C) se différencient dans la région dorsale à proximité du toit du tube. Les motoneurones (M) et les interneurones (V₃) se différencient près de la plaque du plancher (voir Fig. 12.11).



Fig. 12.9 Formation des neurones sensitifs et moteurs dans la moelle

épinière du poulet. Trois jours après la ponte de l'œuf, les motoneurones commencent à se former dans le tube neural embryonnnaire du poulet (à gauche). Un jour plus tard, les motoneurones émettent un axone formant la racine ventrale (à droite). Les neurones primaires sensitifs migrant depuis la partie dorsale du tube neural dérivent des cellules des crêtes neurales et constituent les ganglions segmentaires des racines dorsales (voir Section 9.16) ; leurs axones centripètes entrent en contact avec des types variés de neurones sensitifs secondaires. Parmi ces types, les neurones commissuraux, envoient leurs axones vers la ligne médiane qu'ils franchissent.



Fig. 12.10 Patron dorso-ventral de la moelle épinière impliquant des signaux à la fois dorsaux et ventraux. Les signaux dorsaux et ventraux interviennent lorsque le tube neural se forme (en haut). Le signal ventral est la protéine Shh (en vert) issue de la chorde et de la plaque du plancher, tandis que le signal dorsal inclut BMP-4 (en bleu) qui est induit pendant la formation du tube neural par l'ectoderme adjacent. Les signaux ventral et dorsal sont antagonistes.

Le patron d'expression spatiale des BMP dans le tube neural dorsal est fortement influencé par les signaux ventraux, et ce système présente une grande similitude avec le mécanisme actif dans l'organisation de l'axe dorso-ventral du corps dans le développement précoce de la drosophile. Dans ce cas, l'expression du gène *decapentaplegic* est confinée aux régions dorsales, son expression dans les régions ventrales étant réprimée par le facteur de transcription Dorsal (voir Section 2.16). Tout comme ses homologues des vertébrés, BMP-2 et BMP-4, Decapentaplegic est un membre de la famille des facteurs sécrétés TGF- β . De même, dans la moelle épinière, Shh et les BMP fournissent des signaux de position avec des actions opposées émanant des deux pôles de l'axe dorso-ventral.

12.7 Les sous-types neuronaux de la moelle épinière ventrale sont spécifiés par le gradient ventro-dorsal de Shh

La moelle épinière ventrale contient cinq classes différentes de neurones, les motoneurones et quatre classes d'interneurones, chacun se distinguant par l'expression de gènes spécifiques. Des expériences *in vitro* ont montré que ces sous-types de neurones peuvent être spécifiés d'une manière dose-dépendante par Shh, le signal produit par la chorde et la plaque du plancher. Les différents sous-types de neurones peuvent être générés à partir d'explants de plaque neurale de poulet en réponse à des variations de concentration en Shh d'un facteur deux à trois. L'augmentation progressive de la concentration de Shh est mimée par de plus petits changements de l'activité des facteurs de transcription Gli, activés de façon graduée par la signalisation Shh (voir Encart 11D), et constituant le signal intracellulaire clé de cette signalisation (Fig. 12.11).

Un certain nombre de gènes à homéoboîte de facteurs de transcription sont régulés dans les cellules progénitrices ventrales en réponse à la signalisation Shh, et ces gènes peuvent être divisés en deux catégories, suivant qu'ils sont réprimés (classe I), ou activés (classe II) par Shh (Fig. 12.11). Les niveaux de concentrations seuils de Shh qui permettent l'expression de chaque gène sont différents, de sorte que globalement, les réponses des cellules au gradient de Shh divisent l'axe dorso-ventral de la moelle



Fig. 12.11 Spécification des sous-types neuronaux dans le tube neural ventral. Des soustypes neuronaux différents (indiqués par des couleurs différentes) sont spécifiés le long de l'axe dorso-ventral du tube neural ventral en réponse à un gradient de concentration de Sonic hedgehog (Shh) diffusant depuis la plaque du plancher. Le gradient de Shh se traduit dans les cellules par une activité graduelle du facteur de transcription Gli le long de l'axe dorso-ventral. La signalisation Shh intervient dans la répression des gènes codant les homéoprotéines de classe l (*Pax6, Pax7, Dbx1, Dbx2,* and *Irx3*), alors que les gènes codant les homéoprotéines de Classe ll (*Nkx2.2* and *Nkx6.1*) sont activés. Les interactions entre les gènes de classe l et ll modèlent cette expression ultérieurement. Cinq types de neurones sont générés à partir des cinq domaines. MN, motoneurones ; V, types d'interneurones ventraux.

D'après Jessell, T. M.: Neuronal specification in the spinal cord : inductive signals and transcriptional controls. Nat. Rev. Genet. 2000, **1** : 20-29.



Fig. 12.12 Organisation des colonnes motrices dans la moelle épinière de l'embryon de poulet de 6 jours. La colonne motrice médiane est en bleu, la division médiane de la colonne latérale en rouge et la division latérale en vert. Ces dernières ne sont présentes que dans les régions brachiale et lombaire, en lien avec les membres en développement.

épinière en au moins cinq régions de types différents de progéniteurs neuronaux. Les frontières entre chaque région sont affinées par des interactions croisées répressives entre les protéines de classe I et de classe II.

Le mécanisme exact par lequel Shh spécifie l'activité graduée de Gli dans les différents progéniteurs neuronaux *in vivo* n'est pas encore complètement compris. Comme il est discuté ailleurs pour les morphogènes en général (voir Encart 11B), un modèle simple de diffusion suppose que les cellules occupant différentes positions le long du gradient de concentration d'un morphogène, Shh par exemple, acquièrent des valeurs de position différentes, impliquant l'induction de gènes cibles distincts en fonction de la concentration locale de ce morphogène. Ce modèle est toutefois plus complexe, car la durée de signalisation est également importante, les cellules étant progressivement désensibilisées à la signalisation Shh. Dans ce modèle « d'adaptation temporelle », différentes concentrations locales de Shh agiraient sur des périodes de temps distinctes, si bien que la durée de signalisation serait proportionnelle à la concentration de Shh. Le problème du manque de fiabilité de la seule diffusion dans la mise en place d'un tel gradient serait ainsi résolu car la concentration extracellulaire d'une molécule diffusible change à chaque endroit au fil du temps, et son mouvement est affecté par d'autres molécules extracellulaires.

12.8 Des motoneurones spinaux avec des positions dorso-ventrales distinctes innervent des muscles différents du tronc et des membres

Les motoneurones en développement dans la région ventrale de la moelle épinière peuvent être classés en fonction de la position de leur corps cellulaire le long de l'axe dorso-ventral de la moelle, et des muscles qu'ils innervent. Chez l'embryon de poulet, les motoneurones sont subdivisés en colonnes longitudinales de chaque côté de la ligne médiane, une colonne médiane, la plus proche de la ligne médiane s'étendant sur toute la longueur de la moelle épinière et innervant les muscles axiaux et pariétaux corporels, et une colonne motrice latérale (CML), présente uniquement dans les régions brachiale et lombaire, innervant les membres antérieurs et postérieurs en développement (Fig. 12.12). La CML est divisée en deux bandes, une latérale et une médiane.

Une fois spécifié, chaque sous-type de motoneurone exprime une combinaison différente de facteurs de transcription de la famille à homéodomaine LIM, fournissant au neurone son identité de position au sein de la moelle épinière. Dans la CML, par exemple, les neurones produisant Lim1 siègent dans la division latérale, tandis que ceux qui produisent Isl1 siègent dans la division médiane. Des expériences traçant les axones en croissance des moteneurones de CML, montrent que ceux de la CML latérale innervent les masses musculaires dorsales du bourgeon du membre, alors que les neurones de la CML médiane innervent ventralement le bourgeon du membre (Fig. 12.13). Les mécanismes qui guident l'axone en croissance seront détaillés plus loin dans ce chapitre.



Microphotographie aimablement communiquée par K. Tosney.



12.9 Des signaux sécrétés à partir du nœud de Hensen et du mésoderme adjacent déterminent le patron antéro-postérieur de la moelle épinière

En plus de leur organisation selon l'axe dorso-ventral, les neurones acquièrent des fonctions différentes le long de l'axe antéro-postérieur de la moelle épinière. La régionalisation antéro-postérieure de la fonction neuronale dans la moelle épinière a été illustrée il y a 40 ans par des expériences spectaculaires dans lesquelles un tronçon de moelle épinière, qui aurait normalement innervé des muscles de l'aile d'un embryon de poulet, a été greffé dans la région lombaire innervant normalement les jambes d'un autre embryon. Les poulets se développant à partir des embryons greffés activaient spontanément et en même temps les deux jambes qui mimaient les battements de leurs ailes, plutôt que d'activer alternativement chaque jambe comme dans la marche. Ces études ont montré que les motoneurones générés à un niveau antéro-postérieur donné de la moelle épinière ont des propriétés intrinsèques caractéristiques de cette position.

La destinée des neurones le long de l'axe antéro-postérieur de la moelle épinière est initialement déterminée par des molécules sécrétées par l'organisateur primaire (ou nœud de Hensen), puis par des signaux issus du mésoderme para-axial adjacent (voir Chapitre 5). Ceci a d'abord été montré en greffant du mésoderme para-axial de caille au niveau thoracique chez des embryons de poulet au moment de la fermeture du tube neural. Les neurones thoraciques présomptifs ont alors été spécifiés en neurones brachiaux. Les signaux issus du nœud et du mésoderme forment le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon des gradients qui activent des patrons d'expression des gènes Hox dans les neurones post-mitotiques, donnant une valeur de position aux groupes de neurones et spécifiant leur destinée. Les signaux sont constitués par le FGF, le facteur de croissance/différenciation (GDF *pour Growth Differentiation Factor*), membre de la famille des TGF- β , et l'acide rétinoïque. FGF présente un gradient postéro-antérieur, l'acide rétinoïque et le GDF forment un gradient peu étendu aux extrémités, respectivement, antérieure et postérieure de la moelle épinière.

Les différentes régions le long de l'axe antéro-postérieur de la moelle épinière apparaissent délimitées, comme dans le rhombencéphale, par des combinaisons d'expression des gènes Hox. *Hoxc6* et *Hoxc9* par exemple, sont exprimés respectivement dans les motoneurones de la région brachiale proche du membre antérieur et dans les motoneurones thoraciques. Dans certains sous-types neuronaux, des concentrations variées du facteur de transcription FoxP1 agissent de concert avec les protéines Hox pour spécifier différentes identités neuronales. Ceci s'ajoute à l'expression du gène spécifiant l'identité dorso-ventrale décrite dans la section précédente. Un membre de vertébré typique contient plus de 50 groupes musculaires avec lesquels les neurones se connectent en suivant un patron précis. Les neurones expriment individuellement des combinaisons particulières de gènes Hox qui déterminent l'identité du muscle à innerver.

Collectivement, l'expression des molécules de signalisation à chaque niveau des axes orthogonaux antéro-postérieur et dorso-ventral, conduit à l'expression de gènes contrôlant la transcription à l'origine de destinées régionales et cellulaires distinctes. Les cellules acquièrent leurs identités morphologique et fonctionnelle uniques en fonction de leur « grille de référence » dans ce système cartésien d'information de position.

RÉSUMÉ

Le long de l'axe antéro-postérieur le cerveau en développement est divisé en trois régions, antérieure, moyenne et postérieure, désignant, respectivement, le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Des centres de signalisation situés à la jonction mésencéphale/rhombencéphale et dans le prosencéphale produisent des signaux qui façonnent les régions adjacentes respectives des rhombencéphale, mésencéphale et prosencéphale. Le rhombencéphale est segmenté en rhombomères, au sein desquels les cellules sont confinées. Les gènes Hox fournissent un code définissant des valeurs de position pour les rhombomères, et pour les cellules des crêtes neurales qui en dérivent, tandis que d'autres gènes spécifient les régions plus antérieures. La différenciation des types neuronaux le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière implique des signaux issus à la fois des régions ventrale et dorsale. La sécrétion de Shh par la chorde et la plaque du plancher fournit un signal gradué qui conduit à la spécification de différents sous-types de neurones dans la région ventrale de la moelle épinière. L'identité neuronale le long de l'axe antéro-postérieur de la moelle est définie par des combinaisons d'expression des gènes Hox.

Formation et migration des neurones

L'étape suivante dans le processus de génération du système nerveux va maintenant être considérée : comment, ayant acquis leur identité de position, certaines cellules précurseurs dans le neuroectoderme deviennent des **neuroblastes**, pour ensuite donner des neurones et des cellules gliales. La drosophile, qui a révélé certains processus clés du développement dans la formation de neurones, ou **neurogenèse**, sera d'abord étudiée, avant d'envisager le processus plus complexe de la neurogenèse dans le tube neural de vertébré. Alors que les cellules épithéliales du tube neural prolifèrent et se différencient en neurones, la paroi du tube se développe en une structure multicouche, les neurones migrant vers l'extérieur pour former les différentes couches. La formation de cette structure stratifiée sera examinée au niveau du cortex de mammifère, qui se développe à partir de la région du prosencéphale du tube neural.

Les systèmes nerveux à la fois des non-vertébrés et vertébrés contiennent un nombre considérable de neurones, ainsi que de cellules gliales. Ces dernières se développent également à partir des cellules souches neurales du neuroectoderme, mais la spécification et le développement des cellules gliales ne seront pas décrits en détail ici.

12.10 Chez la drosophile les neurones sont formés à partir des amas proneuraux

Chez la drosophile, les cellules qui donneront naissance au système nerveux central de la larve sont spécifiées à un stade précoce du développement embryonnaire, lors de la mise en place du patron qui divise l'embryon en différentes régions le long des axes dorso-ventral et antéro-postérieur (voir Chapitre 2). Chez les insectes, la chaîne nerveuse principale s'étend ventralement, et non dorsalement comme chez les vertébrés, et le futur système nerveux central est spécifié comme deux régions



Fig. 12.14 Section transversale d'une

gastrula précoce de drosophile. Environ 3 h après la fécondation, le neuroectoderme (en bleu) est localisé ventralement de chaque côté de la ligne médiane. Le mésoderme (en rouge), qui initialement s'étend le long de la ligne médiane ventrale, est déjà internalisé. longitudinales du neuroectoderme dans la moitié ventrale de l'embryon, juste au-dessus du mésoderme. Le neuroectoderme, ou zone neurogène, contient des cellules ectodermiques qui sont engagées pour former soit des cellules neurales (neurones ou cellules gliales) soit de l'épiderme. Après la gastrulation et l'internalisation du mésoderme, le neuroectoderme demeure à l'extérieur de l'embryon, de part et d'autre de la ligne médiane ventrale (Fig. 12.14). Une fois spécifiées comme neuroblastes dans le neuroectoderme, ces cellules se déplacent depuis la surface vers l'intérieur de l'embryon, où elles continuent à se diviser et se différencient en neurones et en glie, formant longitudinalement deux faisceaux d'axones de part et d'autre de la ligne médiane ventrale, connectés à intervalles par des neurones dont les axones croisent la ligne médiane.

Malgré de très grandes différences entre le système nerveux central des insectes et celui des vertébrés, il y a des parallèles fascinants entre les gènes qui façonnent les deux systèmes à un stade très précoce. Les neuroblastes de la drosophile forment trois colonnes longitudinales de cellules de chaque côté de la ligne médiane ventrale, et l'identité de ces colonnes est spécifiée alors que les cellules sont encore dans le neuroectoderme (Fig. 12,15). Les gènes de facteurs de transcription à homéodomaine *msh*, *ind*, et *vnd* sont exprimés selon un ordre dorso-ventral dans le neuroectoderme de la drosophile, sous l'action des premiers gènes organisateurs de l'axe dorso-ventral, comme *rhomboïd* (voir Section 2.16), et de l'activation de la voie de signalisation de l'EGF (*pour Epidermal Growth Factor*) chez la drosophile. La plaque neurale des vertébrés en développement a également trois domaines longitudinaux de futures cellules neurales (voir Fig. 12.15), qui expriment respectivement *Msx*, *Gsh* et *Nkx2.1*, gènes homologues de ceux de la drosophile. Il s'agit d'un exemple frappant de la conservation évolutive d'un mécanisme pour la spécification régionale.

En réponse au patron de l'expression génique précédent, le neuroectoderme de la drosophile se subdivise le long de ses axes antéro-postérieur et dorso-ventral suivant un plan orthogonal précis d'**amas proneuraux**, composés chacun de trois à cinq cellules, qui se distinguent par l'expression de gènes dits **gènes proneuraux** (Fig. 12.16). Dans un premier temps, toutes les cellules d'un amas proneural sont capables de devenir des cellules précurseurs neurales, ou neuroblastes, mais une cellule, par le



Fig. 12.15 Chez la drosophile comme chez les vertébrés le neuroépithélium est organisé en trois colonnes de précurseurs neuraux de chaque côté de la ligne médiane. Le système nerveux central en développement de la drosophile (à gauche) et la plaque neurale de l'embryon de vertébré (à droite) s'organisent tous les deux en trois domaines longitudinaux (colonnes) d'expression génique de chaque côté de la ligne médiane. Les cellules de chacune de ces colonnes expriment un gène à homéoboîte spécifique, et comme cela apparaît avant la neurulation (en haut), des gènes similaires sont exprimés selon le même arrangement médio-latéral chez la drosophile et les vertébrés, avec l'expression de vnd/Nkx2.1 qui est la plus médiane (la plus proche de la ligne médiane), de ind/Gsh s'effectuant dans une position intermédiaire, et de msh/Msx étant la plus latérale.

Fig. 12.16 Amas proneuraux dans le neuroectoderme de l'embryon de drosophile. Au stade de développement présenté ici, il y a huit amas proneuraux dans chaque futur segment, marqués ici par leur expression du gène proneural *achaete* (en noir). La moitié des amas sont formés dans la région où *engrailed* est exprimé (en violet) à l'extrémité postérieure du segment, l'autre moitié dans une région plus antérieure. Certains amas sont réduits à une cellule neurale unique, le futur neuroblaste. L'embryon est vu ici depuis sa face ventrale ; la ligne médiane ventrale se situe au milieu de la photographie.

Microphotographie de Skeath, J. B., et al. : At the nexus between pattern formation and cell-type specification : the generation of individual neuroblast fates in the Drosophila embryonic central nervous system. BioEssays, 1996, **21** : 922-931.

biais d'un événement apparemment aléatoire, produit un signal qui favorise son développement en neuroblastes et empêche les cellules adjacentes de suivre la même destinée. Cette cellule deviendra l'unique neuroblaste de l'amas, et se distinguera, par exemple, par le haut niveau d'expression d'un gène proneural tel que *achaete*, alors que les cellules environnantes n'expriment plus *achaete* et seront à l'origine de l'épiderme (voir Fig. 12.16).

L'individualisation du futur neuroblaste est un exemple d'inhibition latérale (Fig. 12.17) due à une signalisation entre le neuroblaste potentiel et les cellules voisines *via* la protéine transmembranaire Notch et son ligand Delta (voir Encart 5D pour la voie de signalisation Notch-Delta). Toutes les cellules d'un amas proneural peuvent au début produire à la fois Notch et Delta. Une cellule, cependant, commencera à produire Delta plus tôt ou à un taux plus élevé que les autres. Grâce à l'interaction de Delta avec les récepteurs Notch sur ses voisines moins matures, cette cellule inhibe leur développement dans la voie neurale, et supprime également leur expression de Delta (Fig. 12.17, rangée du bas). Ainsi, les cellules initialement équivalentes de l'amas proneural sont réduites, *via* l'inhibition latérale, à ne donner qu'un neuroblaste par amas. Les autres cellules de





Fig. 12.17 Rôle de la signalisation Notch dans l'inhibition latérale au cours du développement neural de l'embryon de drosophile. Dans la rangée supérieure l'amas proneural donne naissance, par inhibition latérale, à une seule cellule précurseur, le neuroblaste. Les autres cellules de l'amas deviennent des cellules épidermiques. Dans la rangée inférieure la présence des protéines Achaete et Scute induit une signalisation Notch entre les cellules de l'amas proneural. Au début le niveau du signal est similaire et maintient les cellules dans l'état proneural. Un déséguilibre se produit guand une cellule (en vert) commence à produire un taux plus élevé de Delta, le ligand de Notch, ce qui active la voie Notch à un niveau plus élevé que dans les cellules voisines. Ce déséquilibre est rapidement amplifié par une voie rétroactive impliquant deux facteurs de transcription, Supppressor of hairless and Enhancer of split. Leurs activités répriment la production des protéines Achaete-Scute et de la protéine Delta dans les cellules concernées, ce qui empêche celles-ci de continuer le processus du développement neuronal et de fournir des signaux inhibiteurs Delta au neuroblaste potentiel (en vert foncé). Les facteurs de transcription à bHLH (pour basic-Helix-Loop-Helix) produits dans le futur neuroblaste activent les gènes requis pour le développement neuronal.

D'après Kandel, E. R., et al. : Principles of Neural Science (4th edition) New York : McGraw-Hill 2000. l'amas proneural cessent de produire Delta et d'exprimer les gènes proneuraux, et continuent sur la voie de différenciation épidermique. Dans l'ectoderme de la drosophile, si la fonction soit de Notch soit de Delta est inactivée, le neuroectoderme fournit beaucoup plus de neuroblastes et moins de cellules épidermiques que la normale.

Après leur spécification, les neuroblastes grossissent, quittent l'épithélium et se déplacent à l'intérieur de l'embryon, où ils se divisent de façon répétée donnant des neurones et des cellules gliales, comme décrit Section 12.13. Chez la drosophile, les neuroblastes sont spécifiés et quittent le neuroectoderme en cinq vagues sur une période d'environ 90 minutes pour former un patron invariant d'environ 30 neuroblastes dans chaque hémisegment (demi-segment latéral) disposés en trois colonnes longitudinales. Chaque neuroblaste a une identité unique basée sur le segment embryonnaire particulier dont il fait partie, sa position dans le segment, le moment de sa formation, et donne lieu à un ensemble distinct de neurones et cellules gliales dans la larve.

12.11 Le développement des neurones chez la drosophile implique des divisions cellulaires asymétriques et des changements dans le temps de l'expression des gènes

Avant de quitter le neuroectoderme, un neuroblaste se polarise selon une direction apico-basale, les extrémités apicales et basales marquées par l'accumulation d'ensembles spécifiques de déterminants cytoplasmiques. Les déterminants à l'extrémité apicale participent à la définition du plan de la division cellulaire en influençant l'orientation du fuseau mitotique, et dirigent aussi le positionnement correct des déterminants de la région basale, qui sont cruciaux pour déterminer la destinée des cellules neurales. Après avoir quitté la surface de l'embryon, le neuroblaste se comporte comme une cellule souche, se divise de façon asymétrique pour donner une cellule apicale plus grande restant une cellule souche neurale, et une cellule basale plus petite, la cellule mère ganglionnaire, qui se divise encore une fois et dont les cellules filles se différencieront en neurones ou cellules gliales (Fig. 12.18). Le facteur de transcription Prospero est l'un des déterminants cytoplasmiques de la région basale hérités par la cellule mère ganglionnaire lors de la division asymétrique. Par puce à ADN, ce facteur a été montré comme régulant des centaines de gènes cibles impliqués dans la suppression du phénotype de cellule souche neurale et dans la stimulation de la différenciation des neuroblastes.



Fig. 12.18 Formation de neurones à partir de neuroblastes par division cellulaire

asymétrique chez la drosophile. Genèse des cellules mères ganglionnaires du système nerveux central par division asymétrique de neuroblaste chez l'embryon de drosophile. Une fois spécifiés, les neuroblastes quittent l'épithélium neuroectodermique et se comportent alors en cellules souches neurales. Chaque neuroblaste se divise de façon asymétrique pour donner une cellule apicale qui reste une cellule souche neuroblastique, et une cellule basale plus petite, la cellule mère ganglionnaire. L'orientation de la division et la destinée cellulaire sont fixées par des déterminants protéiques localisés. La protéine Numb est localisée à une extrémité du neuroblaste avant la division et la cellule fille qui la reçoit devient la cellule mère ganglionnaire qui donnera naissance aux neurones. Prospero et Miranda sont requis pour la localisation correcte de Numb, et Inscuteable (Insc) et Pins sont requis pour l'orientation correcte de la division cellulaire.

ENCART 12A Spécification des organes sensoriels de la Drosophile adulte

Les organes sensoriels de la drosophile adulte représentent un système classique pour étudier à la fois la mise en place des épithéliums à partir desquels ils se développent, et le rôle de la localisation asymétrique des déterminants cytoplasmiques et de la division cellulaire asymétrique produisant une structure composée d'un neurone et de cellules non neuronales. Les drosophiles adultes ont plusieurs types d'organe sensoriel : soies sensorielles (Figure 1) ou autres agissant comme des mécanorécepteurs et chimiorécepteurs, et organes chordotonaux internes détectant l'étirement des tissus. Chaque organe sensoriel est formé de guatre cellules, dont un neurone, et chaque organe provient d'une seule cellule précurseur d'organe sensoriel (POS) qui est initialement spécifiée dans l'épiderme et dans les disques imaginaux des larves selon un patron constant.



Figure 1

Photographie aimablement communiquée par Y. Jan



Figure 2

À la différence des neuroblastes dans le neuroectoderme, la division d'un POS est organisée de telle sorte que les deux cellules filles restent dans l'épiderme (Figure 2), ce qui est révélé par la localisation de la protéine Pins impliquée dans l'orientation du plan de la division cellulaire (à comparer avec Fig. 12.18). La protéine Numb est également localisée de façon asymétrique dans le POS, de sorte qu'une seule cellule fille la reçoit. À la division suivante cette cellule (IIb) va donner un neurone sensoriel et une cellule de gaine, la cellule fille qui reçoit la protéine Numb devenant le neurone. La cellule POS fille qui n'a pas reçu la protéine Numb (IIa) donne à la division suivante deux cellules non neuronales, la cellule soie et la cellule socle. La signalisation Notch est aussi requise pour la différenciation neuronale, en son absence une cellule de gaine apparaît à la place du neurone.

La disposition des soies sensorielles dans l'épiderme de l'aile est déjà organisée dans le disque imaginal. Comme dans le neuroectoderme embryonnaire (voir Section 12.11), les amas proneuraux sont d'abord sélectionnés par l'expression de gènes proneuraux, dans ce cas ceux du complexe *achaete-scute*, selon une configuration spatiale précise. Ce patron est contrôlé par l'utilisation de modules *cis*-régulateurs variés dans l'ADN du complexe *achaete-scute* pour déterminer l'expression du gène à des endroits spécifiques dans le disque

imaginal. Le complexe *achaete-scute* illustre parfaitement le contrôle précis exercé par des régions de contrôle très complexes sur un patron spatial d'expression génique (Figure 3). Le schéma supérieur montre la position des différents modules de contrôle (bandes colorées) qui déterminent l'expression position-spécifique des gènes achaete et scute (en noir). Le schéma inférieur montre l'emplacement des amas proneuraux dans le disque imaginal (à gauche) et des soies sensorielles correspondantes dans l'aile adulte et les segments thoraciques adjacents (à droite), avec des couleurs correspondant à l'activateur responsable de l'expression site-spécifique des gènes.



Figure 3

Schéma d'après Campuzano, S., Molodell, J. : **Patterning of the Drosophila nervous system : the achaete-scute gene complex**. Trends Genet. 1992, **8** : 202-208. Les neuroblastes à différents endroits du corps continuent de se diviser conformément au programme de développement de la drosophile, produisant à chaque division, une cellule mère ganglionnaire et une cellule souche neurale. Un neuroblaste générant plusieurs cellules mères ganglionnaires, les cellules les plus âgées sont poussées plus loin dans l'embryon, ce qui donne une structure stratifiée à la chaîne nerveuse finale. Au fur et à mesure de la neurogenèse, les neuroblastes subissent des changements successifs dans l'expression d'un ensemble particulier de facteurs de transcription, prodiguant leurs identités spécifiques aux neurones produits à des moments différents.

Les neurones ayant des fonctions différentes devant apparaître au bon endroit au sein de la chaîne nerveuse ventrale, la chronologie précise de la transition de l'expression d'un facteur de transcription au suivant dans les neuroblastes, est cruciale pour la formation correcte de la chaîne nerveuse. Le moment de la première transition semble être lié à la division du neuroblaste, tandis que les transitions ultérieures sont liées à un mécanisme temporel intrinsèque au neuroblaste et indépendant de la division cellulaire.

La phase embryonnaire de division des neuroblastes et de neurogenèse fournit un système nerveux central fonctionnel au premier stade larvaire de la drosophile, mais les neurones générés ne représentent qu'environ 10 % des neurones qui sont finalement nécessaires à la forme adulte. Une autre période de neurogenèse, impliquant la plupart des neurones embryonnaires d'origine, se produit avant la métamorphose et fournit les 90 % restants.

Un autre système classique de neurogenèse chez la drosophile est la genèse des soies sensorielles chez l'adulte à partir de cellules neurales qui sont spécifiées dans les disques imaginaux (Encart 12A).

12.12 La production des neurones chez les vertébrés implique, comme pour la drosophile, une inhibition latérale

Les mécanismes impliqués dans la neurogenèse des vertébrés sont à bien des égards remarquablement similaires à ceux de la drosophile. Comme cela a déjà été vu, les cellules du système nerveux des vertébrés dérivent de la plaque neurale, une région épithéliale prismatique induite à partir de l'ectoderme sur la face dorsale de l'embryon pendant la gastrulation et, dans la région de la tête, à partir des placodes sensorielles qui contribuent aux ganglions crâniens sensoriels et produisent les cellules réceptrices sensorielles des yeux (voir Section 11.27), des oreilles et du nez.

Les précurseurs neuronaux ne sont pas générés simultanément sur toute la plaque neurale et dans la zone ventriculaire du tube neural ultérieur, mais, comme chez la drosophile, ils sont d'abord limités à trois bandes longitudinales dans la plaque neurale, de chaque côté de la ligne médiane dorsale (Fig. 1.15). Dans la moelle épinière des vertébrés, la destinée normale de la bande médiane (la plus proche de la ligne médiane), qui deviendra la région ventrale de la moelle épinière, est de donner naissance aux motoneurones. Les bandes plus latérales, qui deviendront les zones latérale et dorsale de la moelle épinière, donnant les interneurones et les neurones sensoriels secondaires (Fig. 12.9).



Fig. 12.19 Une inhibition latérale spécifie une cellule en un précurseur neural dans le système nerveux des vertébrés. Le gène neurogenin est exprimé tout d'abord dans des bandes de cellules contiguës de la plaque neurale, et ces cellules produisent aussi les protéines Delta et Notch. Les interactions Delta-Notch entre les cellules adjacentes inhibent l'expression de *neurogenin*. Quand par hasard une cellule synthétise davantage Delta que ses voisines, la synthèse de la protéine Delta est inhibée dans ses cellules voisines et cette cellule devient un neurone exprimant *neurogenin* et *neuroD*.

La spécification initiale des bandes dans l'ectoderme de la plaque neurale implique une inhibition latérale, avec la signalisation Delta-Notch entre cellules adjacentes limitant l'expression des gènes proneuraux et spécifiant les neuroblastes comme chez la drosophile (Fig. 12.19). Les neuroblastes potentiels des trois bandes expriment Delta plus fortement que leurs cellules adjacentes, et la boucle de rétroaction mise en place par l'activation de Notch dans les cellules adjacentes réprime l'expression du gène proneural, ne laissant l'expression des gènes proneuraux qu'aux neuroblastes potentiels. Les protéines proneurales des vertébrés, comme le facteur de transcription Neurogénine, sont des homologues des facteurs de transcription proneuraux de la drosophile, alors que les protéines qui inhibent la spécification en cellules neurales sont des homologues vertébrés du facteur de transcription Suppressor of Hairless activé par Notch et ayant Enhancer of split comme gène cible (Fig. 12.17). Les cellules produisant la Neurogénine continuent d'exprimer des gènes caractéristiques de la différenciation neuronale, tel que NeuroD. La confirmation du rôle de Notch et Delta chez les vertébrés provient de la surexpression transgénique de Delta dans la plaque neurale ou d'un mutant exprimant Notch de façon continue, les deux cas résultant en une réduction du nombre de neurones formés. L'inhibition de Delta, par ailleurs, conduit à une augmentation du nombre de neurones, comme le fait la surexpression du gène neurogenin.

Le tube neural formé à partir de l'ensemble de la plaque neurale chez les amphibiens (voir Chapitre 4), contiendra à la fois les précurseurs neuronaux déterminés exprimant le gène *neurogenin*, et les cellules dans lesquelles il est réprimé. Ces dernières forment dans le tube neural un groupe de précurseurs neuronaux potentiels indifférenciés, qui peut être mis en jeu plus tard, lorsque la première vague de neuroblastes formés arrête de se diviser et commence à se différencier. Cela permet la poursuite de la neurogenèse sur une période de temps relativement longue. Chez les mammifères et les oiseaux, le tube neural qui donnera la moelle épinière est dérivé de cellules de la zone souche lorsque l'embryon s'allonge et que le nœud de Hensen régresse (Chapitre 5).

12.13 Les neurones sont formés dans la zone proliférative du tube neural des vertébrés et migrent vers l'extérieur

Chez les embryons de vertébrés, les neurones et les cellules gliales du cerveau et de la moelle épinière sont tous issus d'une couche proliférative de cellules épithéliales tapissant la lumière du tube neural nommée **zone ventriculaire**. Pendant de nombreuses années, le cerveau des mammifères adultes a été considéré comme incapable de générer de nouveaux neurones, bien que la neurogenèse adulte ait été décrite dans le cerveau des oiseaux chanteurs, des reptiles, des amphibiens et des poissons. Des cellules souches neurales, dont l'existence est maintenant reconnue dans des régions limitées du cerveau adulte des mammifères, peuvent donner naissance à de nouveaux neurones et des cellules gliales, comme cela est décrit dans la Section 8.13.

Comme il a été vu aux Chapitres 5 et 9, le tube neural est initialement constitué d'une seule couche épithéliale. La division des cellules du tube neural conduit la zone ventriculaire à se développer, sur la face interne du tube, en une zone de cellules prolifératives arrondies. Dans la plupart des régions du système nerveux, la prolifération est limitée à une seule couche, mais dans certaines régions du prosencéphale, la prolifération et la neurogenèse sont aussi assurées par une **zone sous-ventriculaire**, qui est exceptionnellement épaisse dans le cerveau humain.

Une fois formés, les neurones migrent à partir de la zone ventriculaire vers l'extérieur et constituent le tissu nerveux en couches concentriques. Les couches de corps cellulaires neuronaux, la **zone du manteau** ou **substance grise**, se forment à l'extérieur de la zone ventriculaire, avec des vagues successives de nouveaux neurones traversant les couches des premiers neurones formés. Les axones émis par ces cellules forment la couche la plus externe, la **zone marginale**. Par la suite, les axones se myélinisent et la zone marginale forme la **substance blanche**. Le tube neural creux se développe finalement de cette façon en moelle épinière creuse et en cerveau avec ses ventricules remplis de fluide qui représentent les vestiges de la lumière du tube neural. Cet arrangement, avec un cœur interne de substance grise entouré d'une enveloppe de substance blanche, caractérise toutes les régions du système nerveux central, sauf le cortex cérébral. Ici, comme cela sera vu, la relation entre les substances grise et blanche est inversée : le cortex a la plupart de ses corps cellulaires situés en périphérie, tandis que les axones progressent vers l'intérieur pour former une zone intermédiaire de substance blanche adjacente à la zone ventriculaire. En gardant la matière grise relativement extensible à l'extérieur de la matière blanche plus rigide, le cortex des mammifères a acquis un grand potentiel d'expansion au cours de l'évolution.

Les cellules progénitrices neurales de la zone ventriculaire sont des cellules souches neurales multipotentes, qui donnent naissance à de nombreux types de neurones différents et aux cellules gliales. Dans la zone ventriculaire du télencéphale dorsal, par exemple, des cellules appelées **cellules de la glie radiaire** peuvent agir comme des cellules souches neurales, générer à la fois la glie radiaire dont le rôle est décrit ci-dessous, et certains types de neurones. Comme toute cellule souche, les cellules souches neurales doivent générer à la fois des précurseurs neuraux et d'autres cellules souches. Pour y parvenir deux façons d'opérer semblent coexister dans le système nerveux en développement. La cellule souche peut se diviser soit « verticalement » et donner naissance à deux cellules semblables, deux cellules souches ou deux neurones, soit horizontalement, parallèlement à la surface ventriculaire, et donner une cellule fille qui reste cellule souche et l'autre qui deviendra un neurone. Les divisions verticales produisant de plus en plus de cellules souches prédominent durant les premiers stades de croissance du cerveau, et cèdent la place à un nombre plus important de divisions horizontales avec l'accélération de la neurogenèse.

Une fois spécifiées comme neuroblastes, les cellules migrent de la face interne du tube neural vers sa face externe. Le processus de production des neurones et de leur migration, spécifique des mammifères, va être décrit au niveau du cortex qui se développe à partir du télencéphale embryonnaire dorsal (le pallium). Le cortex est organisé en six couches (I-VI), numérotées de la surface corticale vers l'intérieur, et chaque couche contient des neurones avec des formes et des connexions distinctes. Les grandes cellules pyramidales, par exemple, qui projettent leurs axones sur de longues



Fig. 12.20 Les neurones pyramidaux du cortex migrent le long de la glie

radiaire. Les neurones générés dans la zone ventriculaire rejoignent leur position finale dans le cortex en migrant le long de la glie radiaire qui s'étend sur toute la paroi du tube neural.

Illustration d'après Rakic, P. : **Mode of cell** migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J. Comp. Neurol. 1972, **145** : 61-83.

ENCART 12B Chronologie de la naissance des neurones corticaux

La date de naissance d'un neurone détermine la couche corticale à laquelle il appartiendra. Cette date correspond à l'instant où la cellule précurseur cesse de se diviser et quitte le cycle mitotique. Les premières expériences réalisées dans les années 1960 et 1970, ont utilisé des isotopes radiomarqués pour repérer les cellules et ainsi suivre leur migration. Si les précurseurs de neurones sont mis en contact rapide avec un composé marqué pouvant être incorporé dans l'ADN, les cellules qui subissent leur dernier cycle de réplication immédiatement après avoir incorporé le composé, auront leur ADN le plus fortement marqué. Si elles continuent à se diviser et à répliquer leur ADN, le marquage se diluera dans leur descendance. Les



Figure 1

cellules qui arrêtent de se diviser dès l'incorporation du marquage, peuvent donc être distinguées et leur destination finale détectée.

La Figure 1 montre les résultats originaux d'une expérience de ce type qui a déterminé l'ordre dans lequel les neurones ont atteint leurs couches définitives dans le cortex visuel du singe. La thymidine radiomarquée ([³H] thymidine), qui est incorporée lors de la réplication de l'ADN, a été injectée dans le tube neural à différents moments de son développement. Les barres rouges représentent la distribution des neurones fortement marqués observés après chaque injection. Les neurones nés les premiers restent le plus près de leur lieu de naissance, la zone ventriculaire proliférative. Les neurones nés plus tard constituent les couches corticales de plus en plus superficielles. Les couches corticales sont numérotées à partir de la surface du tube neural vers l'intérieur, autrement dit, la couche VI est la couche la plus proche de la zone ventriculaire. Actuellement pour ce type d'expérience, le marquage radioisotopique est remplacé en marquant les cellules avec, par exemple, des retrovirus incompétents pour la réplication et porteurs d'un gène marqueur tel que *lacZ*, dont le produit peut être détecté par histochimie.

distances vers des cibles sous-corticales, sont concentrées dans la couche V, et des neurones plus petits qui reçoivent l'arrivée des afférences thalamiques prédominent dans la couche IV. Tous les neurones excitateurs du cortex, qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur, ont leur origine dans la zone ventriculaire du pallium et migrent vers leurs positions finales le long de cellules de la glie radiaire, cellules très effilées qui s'étendent à travers le pallium en développement (Fig. 12.20). La représentation en trois dimensions des fibres radiaires et des neurones en migration a été minutieusement reconstruite dans les années 1960 et 1970 à partir d'images en microscopie électronique de coupes successives de cortex fœtal de singe et de reconstructions dessinées à la main dans leurs moindres détails. Les interneurones, les plus petits et les plus nombreux du cortex, qui sont inhibiteurs et utilisent l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur, sont principalement générés dans le sous-pallium, et une fois formés ils doivent migrer dorsalement vers leurs positions finales dans le cortex.

La couche corticale vers laquelle les neurones migrent après leur naissance dans la couche proliférative est liée au moment où le neurone est né, et l'identité d'un neurone cortical est considérée être spécifiée avant qu'il ne commence à migrer. La plupart des neurones du système nerveux central des mammifères ne se divisent plus, une fois spécifiés, ce qui explique pourquoi les neurones nouvellement formés sont souvent appelés **neurones post-mitotiques**. La naissance d'un neurone est définie par la dernière division mitotique subie par sa cellule progénitrice. Les expériences qui ont en premier établi la relation entre la date de naissance d'un neurone et la couche à laquelle il appartient, sont décrites dans l'Encart 12B. Les neurones nouvellement formés sont encore immatures. Ils émettront un axone et des dendrites plus tard (Fig. 12.2), et adopteront alors la morphologie d'un neurone mature.

LES + EN LIGNE

Animation montrant la migration d'un neuroblaste



Fig. 12.21 Genèse des couches de neurones dans le cortex de

mammifère. Le développement du cortex débute (à gauche) avec la migration radiaire de la première vague de neurones post-mitotiques à partir de la zone ventriculaire (ZV, en vert) vers la face externe du tube neural pour former la pré-plaque (PP, en noir). La deuxième vague de neurones nouvellement formés (en bleu) migre sur les fibres de la glie radiaire (en gris) à travers la couche inférieure de la pré-plaque pour former les neurones de la première couche de la plaque corticale (PC). La couche supérieure de la pré-plaque devient la zone marginale superficielle (ZMS), et deviendra la couche corticale I (les couches corticales sont numérotées de la plus superficielle à la plus profonde), alors que la couche la plus profonde de la pré-plaque devient la sousplaque (SP), qui subira plus tard la mort cellulaire programmée. La zone ventriculaire fait apparaître une troisième vague de neurones (en jaune) qui migrent à travers la première couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones de la plaque corticale pour former la deuxième couche des neurones

de la plaque corticale. L'augmentation du nombre de divisions horizontales (asymétriques) des précurseurs dans la zone ventriculaire et dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) générée par la suite, formera successivement les couches plus superficielles de la plaque corticale (en orange et rouge). Finalement, les six couches de la plaque corticale sont toutes en place et les axones des principales couches de projection (V et VI) progressent vers l'intérieur, vers ZV, puis obliquent dans la zone intermédiaire de la future substance blanche. La zone intermédiaire (ZI) contient les interneurones inhibiteurs (en violet) migrant essentiellement depuis le sous-pallium mais aussi du pallium ZV, et entrent maintenant dans la plaque corticale. Le temps est donné pour le développement de la souris en jours *in utero*.

D'après Honda, T., et al. : **Cellular and molecular mechanisms of neuronal migration in neocortical development**. Semin. Cell Dev. Biol. 2003, **14 :** 169-174.

Les neurones nés à des stades précoces du développement cortical migrent vers les couches les plus proches de leur site de naissance, alors que ceux qui sont nés plus tard vont plus loin, dans les couches les plus superficielles (Fig. 12.21). Pour atteindre leur position correcte, les neurones les plus jeunes doivent migrer à travers les plus anciens, donnant lieu à des couches et des colonnes de corps cellulaires. La première couche formée qui reste en position neuronale dans le cortex ont apporté une avancée considérable pour la compréhension du processus. La souris *reeler* a une coordination motrice très déficiente, ce qui est peu surprenant étant donné la disposition inversée

de ses couches corticales. Le gène *reeler* code une molécule de la matrice extracellulaire, la Réeline, qui est normalement produite dans la première couche formée, la plus externe du cortex. Des mutations sur *reeler* entraînant une perte de la protéine Réeline perturbent la migration neuronale radiaire, avec des vagues successives de neurones incapables de passer à travers la couche formée par leurs prédécesseurs. Contre toute attente, la migration des neurones dans le cerveau en développement est en fait beaucoup plus compliquée que ce qui est décrit ici. En plus de la migration radiale, les neurones du cerveau migrent également tangentiellement dans la paroi du tube neural selon un processus indépendant des fibres gliales radiaires.

12.14 De nombreux interneurones corticaux migrent tangentiellement

Les neurones immatures migrent tous radiairement loin de leur lieu de naissance dans la zone ventriculaire, et se dirigent vers la surface du cerveau. La plupart des neurones cessent alors leur déplacement et émettent un axone et des dendrites. Dans quelques endroits cependant, les neurones ne se fixent pas à la fin de leur migration radiaire, mais continuent à se déplacer dans une direction alors tangentielle, parallèle à la surface du cerveau. Dans le cas des interneurones corticaux GABAergiques, cette migration tangentielle implique un grand nombre de cellules qui se déplacent sur une distance considérable, depuis leur lieu d'origine dans le sous-pallium (l'éminence ganglionnaire médiane, Fig. 12.22), vers différents points du pallium dorsal, où ils s'intercalent entre les neurones glutamatergiques de la plaque corticale en formation. Les études sur les mécanismes moléculaires dirigeant cette migration ont révélé des protéines sécrétées nommées neurégulines, qui diffusent depuis l'éminence ganglionnaire latérale et la plaque corticale et induisent, respectivement, deux types de chimioattraction, à courte et longue distance. Ces protéines agissent sur les récepteurs ErbB4 portés par les interneurones. L'attraction par des molécules libérées par la voie et la cible est complétée par une répulsion, qui implique un autre groupe de protéines, les sémaphorines, sécrétées par l'éminence ganglionnaire médiane. Les sémaphorines agissent sur les interneurones via des récepteurs appelés neuropilines.

Ce processus remarquable de migration tangentielle trouve une raison d'être dans l'obligation de proximité qu'ont les neurones glutamatergiques (excitateurs) et GABAergiques (inhibiteurs) pour la constitution d'un réseau fonctionnel correct. Le mécanisme de la spécification des cellules dans le télencéphale ne pouvant générer ces deux types cellulaires distincts qu'à des positions différentes le long de l'axe dorso-ventral, la migration est requise pour rapprocher ces deux types de neurones.



Fig. 12.22 Origine et migration tangentielle des interneurones corticaux. Le schéma de la coupe transversale du télencéphale gauche d'un embryon de souris présente les principales régions de neurogenèse en fonction du type de neurotransmetteur : les interneurones GABAergiques migrent à partir du souspallium (éminences ganglionnaires latérale et médiane, EGL et EGM en vert) ; les neurones glutamatergiques naissent à partir du pallium (cortex, Cx, et hippocampe, H, en violet); les neurones cholinergiques forment la région la plus ventrale (aire préoptique, APO, en bleu). Les flèches vertes montrent les voies de migration prises par les neurones GABAergiques à partir du sous-pallium vers le pallium, pouvant atteindre le futur hippocampe (H).

D'après Marin, O., Rubenstein, J.L.R. : A long, remarkable journey : Tangential migration in the telencephalon. Nat. Rev. Neurosci. 2001, 2 : 780-790.

RÉSUMÉ

Chez la drosophile, le tissu nerveux potentiel est spécifié au début du développement en une bande de neuroectoderme le long de l'axe dorso-ventral. Au sein de celui-ci, l'expression des gènes proneuraux délimite des amas de cellules neuroectodermiques avec le potentiel pour former des cellules neurales. À la suite d'une inhibition latérale impliquant Notch et Delta, une seule cellule de l'amas donnera finalement un neuroblaste. Les neuroblastes qui donnent le système nerveux central se comportent comme des cellules souches, subissant des divisions asymétriques répétées, chacune d'elles donnant un neuroblaste et une cellule fille qui pourra donner des neurones.

Le système nerveux des vertébrés est dérivé de la plaque neurale, qui est spécifiée lors de la gastrulation et qui contient les cellules formant le cerveau. Les cellules des crêtes neurales contribuent à la formation du système nerveux périphérique. Les futures cellules neurales potentielles sont initialement spécifiées au sein de la plaque neurale par un mécanisme d'inhibition latérale, similaire à celui de la drosophile. Les neurones naissent dans la zone proliférative à la face interne du tube neural, puis migrent à des sites distincts au cours du développement de l'encéphale et de la moelle épinière.



Navigation axonale

Fig. 12.23 Les neurones établissent des

connexions précises avec leurs cibles. Les neurones (en vert) et leurs cellules cibles (en bleu) apparaissent en général en des endroits différents. Leurs connexions s'établissent grâce à l'élongation axonale, guidée par le mouvement de l'extrémité axonale (cône de croissance). Souvent un ensemble initial de connexions synaptiques relativement peu spécifiques est affiné de manière à produire un patron de connexité plus précis.

Illustration d'après Alberts, B., et al. : Molecular Biology of the Cell, 2nd edition. New York : Garland Publishing, 1989. Ce paragraphe est consacré à une caractéristique du développement qui est unique au système nerveux, l'allongement et le guidage des axones vers leurs cibles finales. Cette étape de la différenciation neuronale se produit principalement après la migration des neurones post-mitotiques immatures à leurs emplacements définitifs. Chaque corps cellulaire de neurone émet un axone et des dendrites, grâce auxquels il enverra et recevra des signaux, respectivement. Le fonctionnement du système nerveux dépend de la formation de circuits neuronaux distincts, au sein desquels les neurones établissent des connexions nombreuses et précises les uns avec les autres (Fig. 12.23). Dans la suite de ce chapitre, vont être abordés la façon dont ces connexions sont mises en place dans des situations variées, les mécanismes permettant aux axones de croître et d'établir des contacts avec d'autres cellules, ceci avec une grande précision. L'allongement de l'axone et son guidage spécifique vers sa cible vont tout d'abord être étudiés ici.





12.15 Le cône de croissance contrôle le trajet suivi par l'axone en cours de croissance

Un événement précoce dans la différenciation d'un neurone est l'extension de son axone grâce à la croissance et la migration du cône de croissance à l'extrémité de l'axone (Fig. 12.24). Le cône de croissance est spécialisé à la fois dans le mouvement et la détection de signaux de guidage dans son environnement. Comme pour d'autres cellules douées de migration, tel que celles du mésenchyme primaire de l'embryon d'oursin (voir Section 9.8), le cône de croissance émet et rétracte sans cesse des filopodes à sa périphérie, établissant et rompant des contacts avec le substrat sous-jacent pour entraîner l'axone vers l'avant. Entre les filopodes, le bord du cône de croissance forme de minces ondulations, les lamellipodes, semblables à ceux d'un fibroblaste mobile (voir Encart 9B). Le cône de croissance ressemble en effet étroitement, dans son ultrastructure et son mécanisme de mouvement, à la pointe d'un fibroblaste rampant sur une surface. À la différence d'un fibroblaste mobile, cependant, l'axone en progression croît aussi en longueur et en diamètre, avec une augmentation concomitante de la surface totale de la membrane plasmique du neurone. La membrane additionnelle est fournie par les vésicules intracellulaires, qui fusionnent avec la membrane plasmique.

Le cône de croissance guide l'extension axonale, et est influencé par les contacts des filopodes avec d'autres cellules et avec la matrice extracellulaire. En général, le cône de croissance se déplace en direction des contacts les plus stables établis par ses filopodes. En outre, la direction de sa migration peut être influencée par des molécules de signalisation extracellulaire diffusibles qui se lient à des récepteurs à la surface du cône de croissance. Certains de ces signaux extracellulaires favorisent l'extension des axones, tandis que d'autres l'inhibent en provoquant la rétraction des filopodes et l'« effondrement » du cône de croissance. L'extension et la rétraction des filopodes et des lamellipodes impliquent l'assemblage et le démantèlement du cytosquelette d'actine. De nombreux signaux extracellulaires affectant le guidage axonal sont connus pour avoir des effets sur le cytosquelette d'actine *via* des protéines de signalisation intracellulaires de la famille des GTPases apparentées à Ras. Mais la façon précise dont les cônes de croissance traduisent les signaux extracellulaires de manière à étendre ou rétracter leurs filopodes n'est pas encore entièrement comprise.

Les cônes de croissance axonaux sont guidés par deux types principaux de signaux, attractif et répulsif. De plus, les signaux peuvent agir à courte ou longue distance, offrant ainsi quatre façons de guider le cône de croissance (Fig. 12.25). L'attraction à longue distance implique des molécules chimiotactiques diffusibles libérées par les cellules cibles. En revanche, des molécules chimiotactiques ou chimorépulsives ont été identifiées dans le système nerveux en développement. Le

Fig. 12.24 Axone en développement et cône de croissance. L'axone émergeant du corps cellulaire se termine par une structure motile nommée cône de croissance. À partir du cône de croissance de nombreux filopodes sont en perpétuelles extensions et rétractions afin d'explorer l'environnement alentour. Barre d'échelle = 10 µm.

Microphotographie aimablement communiquée par P. Gordon-Weeks.

Fig. 12.25 Mécanismes de guidage

axonal. Quatre types généraux de mécanismes peuvent contribuer au contrôle de la direction prise par un cône de croissance : attraction à longue distance, répulsion à longue distance, attraction à courte distance, répulsion à courte distance. Des signaux à longue distance sont fournis par des molécules sécrétées (telles que les nétrines et sémaphorines) qui forment des gradients dans la matrice extracellulaire. Des signaux à courte distance sont en général constitués par des protéines membranaires telles que les éphrines et leurs récepteurs Eph, et les cadhérines qui se lient à d'autres cadhérines sur les cellules voisines.



guidage à courte distance est assuré par des mécanismes dépendant de contacts impliquant des molécules liées aux autres cellules ou à la matrice extracellulaire, de telles interactions pouvant être soit attractives soit répulsives. Certains signaux peuvent avoir un rôle attractif ou répulsif, en fonction du contexte cellulaire et du développement.

Un certain nombre de molécules extracellulaires distinctes guidant les axones ont été identifiées. Les sémaphorines constituent une des plus importantes familles de molécules de guidage axonal. Il y a sept sémaphorines distinctes, trois sont sécrétées, tandis que les autres sont associées à la membrane cellulaire. Il existe deux classes de récepteurs neuronaux pour les sémaphorines, les plexines et les neuropilines. La répulsion axonale est un rôle majeur de l'action des sémaphorines. Certaines peuvent toutefois soit attirer soit repousser les cônes de croissance, selon la nature du neurone et le type de récepteur des sémaphorines présent au niveau de la membrane des neurones. Des régions différentes d'un même neurone peuvent répondre de façon opposée à un même signal. Ainsi, les dendrites apicales des neurones pyramidaux du cortex sont attirées vers une source de Sémaphorine 3A, qui repousse leurs axones, ce qui permet aux dendrites réceptrices et à l'axone transmetteur d'être orientés dans des directions opposées par un même signal. Cette différence dans la réponse semble être due à la guanylate-cyclase, un élément de la voie de transduction du signal de la sémaphorine présente dans les dendrites, mais pas dans l'axone. Le rôle directeur des sémaphorines dans la formation du circuit neuronal simple qui assure le réflexe rotulien est discuté dans l'Encart 12C.

Les **nétrines** sont des protéines sécrétées constituant une autre classe de protéines de guidage neuronal bidirectionnel, en attirant certains neurones et en repoussant d'autres. La fonction attractive des nétrines se réalise *via* des récepteurs de la famille DCC (pour *Deleted in Colorectal Cancer*) sur les cônes de croissance. Les **protéines Slit** sont des glycoprotéines sécrétées avec une fonction répulsive. Elles repoussent une variété de classes d'axones en agissant sur les récepteurs de la famille **Robo** des neurones, mais elles peuvent aussi stimuler l'allongement et la ramification des axones sensoriels.

Les molécules de guidage agissant par des contacts à courte distance comprennent les **éphrines** membranaires et leurs **récepteurs Eph** (voir Encart 9D), qui, dans le système nerveux interviennent dans les interactions principalement répulsives, et les **cadhérines**, qui se lient à d'autres cadhérines présentes sur les cellules adjacentes (voir Encart 9A), et peuvent agir comme attracteurs d'axones à courte distance. L'implication des éphrines dans le guidage des axones des motoneurones de la moelle épinière vers les muscles cibles appropriés du membre sera abordée dans la section suivante.



ENCART 12C Développement du circuit neuronal dans le réflexe rotulien

Figure 1

Les mécanismes responsables de la formation des circuits neuronaux font l'objet d'un grand intérêt aujourd'hui. La formation d'un circuit particulier doit intégrer plusieurs mécanismes examinés dans ce chapitre : la spécification et la migration neuronales, la navigation axonale, et la reconnaissance neurone-neurone, étant les plus importants. La formation d'un circuit simple est illustrée ici qui ne comprend que deux neurones, un neurone sensoriel et un motoneurone qui interviennent dans le réflexe rotulien bien connu.

Le réflexe rotulien est provoqué par la percussion du tendon rotulien juste en dessous du genou, ce qui allonge le muscle quadriceps et provoque l'extension de la jambe. C'est l'exemple classique du réflexe d'étirement du muscle qui détecte et répond aux variations de longueur du muscle (proprioception), et est responsable du maintien de la posture des membres et du corps. Dans le circuit réflexe (Figure 1, à gauche), les récepteurs à l'étirement (fuseaux, en orange) du quadriceps détectent l'augmentation de longueur du muscle. Ils sont innervés par de gros neurones sensoriels proprioceptifs à conduction rapide, (afférences la, en bleu), qui ont leurs corps cellulaires dans le ganglion de la racine dorsale (GRD) du segment L4 de la moelle épinière. L'axone du neurone sensoriel contacte directement les dendrites du motoneurone (en vert) dans la corne ventrale du même segment, dont l'axone innerve le muscle quadriceps et commande sa contraction. Ce circuit monosynaptique fonctionne simultanément avec un circuit disynaptique, qui comprend un interneurone inhibiteur (en rouge) qui empêche réciproquement la contraction des muscles antagonistes, dans ce cas, les ischio-jambiers. Ce circuit simple permet d'étudier la façon dont l'axone du neurone sensoriel trouve et contacte le motoneurone correct au cours du développement.

Les axones de tous les neurones sensoriels des GRD pénètrent la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 1, à droite), mais alors que ceux qui relaient la douleur et la thermoception (en violet) se terminent près de leur point d'entrée, où ils établissent des synapses avec des interneurones, ceux qui relaient la proprioception (en bleu) continuent ventralement et contactent les dendrites des motoneurone appropriés (en vert), en évitant les motoneurones qui innervent les muscles antagonistes. La Sémaphorine 3, produite dans la moelle épinière ventrale, permet de repousser tous les axones sensoriels en croissance à l'exception des afférences la.

La reconnaissance entre les partenaires pré- et post-synaptiques semble impliquer au moins deux types de mécanismes. L'axone sensoriel et les dendrites motrices poussent d'abord vers un point de rencontre commun, nommé zone de terminaison. Comme une « grille de référence » cette zone est définie par un système de coordonnées de l'information de position à travers les axes dorso-ventral et médio-latéral de la moelle épinière, fourni par des gradients orthogonaux de molécules de guidage axonal telles que les Sémaphorines et les Slits.

La capacité de détecter et de répondre correctement à ces gradients fait partie de la spécification de chaque neurone. Ceci a été démontré par une expérience dans laquelle les positions des neurones moteurs dans la colonne motrice latérale de la souris (Fig. 12.12) sont perturbées, mais pas celles des neurones sensoriels. Dans cette situation, les axones sensoriels la se terminent toujours au bon endroit, même s'ils contactent « les mauvais » motoneurones. Une analogie utile pour examiner comment ces axones et ces dendrites poussent vers la même zone dans la moelle, et comment ces zones de terminaison sont définies, est le « modèle de l'horloge d'une gare », où deux personnes éloignées reçoivent des instructions pour s'y rencontrer. Une fois que la terminaison axonale est en place, un deuxième mécanisme de reconnaissance entre en jeu. Ce dernier est probablement un mécanisme spécifique de type « clé-serrure » fourni par les récepteurs-ligands et des interactions d'adhérence à la surface des cellules pré- et post-synaptiques.

Bien que des progrès remarquables aient été accomplis pour comprendre comment deux neurones se rencontrent et se connectent l'un l'autre, la compréhension de circuits « simples » comme celui-ci, et d'autres comparables, est encore loin d'être complète, et peu de choses sont connues sur le mécanisme moléculaire permettant un appariement précis.



12.16 Les axones des motoneurones du membre de poulet sont guidés par

des interactions éphrines- Eph

Le système musculaire permet à un animal de réaliser une gamme étendue de mouvements, qui dépendent tous de motoneurones du tronc cérébral et de la moelle épinière ayant pris le bon chemin et ayant établi les connexions appropriées avec les muscles pendant le développement embryonnaire. Le patron d'innervation de l'aile de poulet, par exemple, est précis et toujours le même (Fig. 12.26). Comme cela a été abordé dans les Sections 12.8 et 12.9, des groupes particuliers de motoneurones qui innerveront des muscles spécifiques du membre se distinguent déjà par l'expression de combinaisons particulières de gènes LIM et Hox dans la moelle épinière. Cependant, pour atteindre leurs cibles correctes, les axones en croissance nécessitent des signaux de guidage locaux et ceux-ci sont fournis par les tissus du membre.

Chez l'embryon de poulet, les axones des motoneurones entrent dans le bourgeon de membre en développement environ 4,5 jours après que les éléments de cartilage et les masses musculaires dorsales et ventrales ont commencé à se former. Dès que les axones moteurs émis à partir de la moelle épinière atteignent la base du bourgeon du membre, ils se mélangent tous en un seul faisceau. À la base du bourgeon de membre, cependant, les axones se séparent et forment de nouveaux nerfs ne contenant que les axones qui établiront des connexions avec des muscles précis.

Des expériences chez l'embryon de poulet ont apporté la preuve que cette sélection dépend de signaux locaux émis par le membre. Un tronçon de moelle épinière comportant les motoneurones qui auraient innervé le membre postérieur, est inversé avant que les axones ne poussent. Après une inversion selon l'axe antéro-postérieur, les axones moteurs des segments lombo-sacrés 1-3, qui pénètrent normalement les parties antérieures du membre, s'engagent d'abord dans les régions postérieures des membres, puis prennent des chemins nouveaux pour innerver les muscles appropriés. Ainsi, même lorsque les faisceaux d'axones entrent en sens inverse le long de l'axe antéro-postérieur, la connexion correcte s'établit entre les motoneurones et les muscles. Les axones moteurs peuvent ainsi retrouver leurs muscles appropriés après avoir été déplacés par rapport au membre, à condition que le décalage soit limité. Toutefois, après une inversion dorso-ventrale complète du bourgeon du membre, équivalant à une inversion antéro-postérieure sur au moins cinq segments, les axones moteurs ne retrouvent plus leurs cibles musculaires correctes. Dans ce cas, les axones ont suivi des voies normalement prises par d'autres neurones. Le mésoderme du membre fournit ainsi des indices locaux pour les axones moteurs, et les axones ont eux-mêmes une identité qui leur permet de choisir la voie correcte.

Ces signaux locaux comprennent des molécules telles que les éphrines membranaires. Les motoneurones de la division médiane de la colonne motrice latérale (CML) innervent les masses musculaires ventrales du membre, alors que ceux de la division latérale de la CML innervent les muscles dorsaux des membres (Fig. 12.13). La signalisation EphA4 des axones moteurs de la CML latérale est un déterminant

Fig. 12.26 Innervation de l'aile de l'embryon de poulet. Les nerfs sont colorés

en brun et comprennent les nerfs sensitifs et moteurs. Barre d'échelle = 1 mm.

Photographie aimablement communiquée par J. Lewis.





majeur de la route dorsale qu'ils prennent dans le membre. EphA4 intervient dans la médiation répulsive conjointement avec son ligand éphrine A, qui est limité au mésenchyme ventral du membre. La production de EphA4 est déterminée par les protéines à homéodomaine LIM (voir Section 12.8), avec une production de Lim1 dans les motoneurones de la CML latérale conduisant à des niveaux élevés de EphA4, tandis que la production de Isl1 dans les neurones de la CML médiane conduit à une réduction de EphA4. La concentration de l'éphrine A dans le mésenchyme dorsal du membre est apparemment maintenue à un niveau bas par la production de la protéine LIM, Lmx1b (Fig. 11.16). La migration des axones moteurs de la CML médiane dans le mésenchyme ventral du membre semble être régulée par un autre ensemble de récepteurs qui répondent de façon similaire à des signaux répulsifs du mésenchyme dorsal du membre.

12.17 Les axones franchissant la ligne médiane sont à la fois attirés et repoussés

Le développement du système nerveux, en grande partie symétrique par rapport à la ligne médiane du corps, se déroule indépendamment de chaque côté, mais une moitié du corps a besoin de savoir ce que l'autre moitié est en train de faire. Ainsi, bien que certains neurones doivent rester entièrement à l'intérieur de la moitié du corps dans laquelle ils ont été générés, de nombreux axones doivent traverser la ligne médiane de l'embryon. Des molécules chimioattractantes et chimiorépulsives sont impliquées dans ces décisions.

Dans la moelle épinière des vertébrés, les neurones commissuraux assurent les liaisons entre les deux côtés de la moelle. Les corps cellulaires des neurones commissuraux sont situés dans la région dorsale, mais envoient leurs axones ventralement le long de la bordure latérale de la moelle. Des signaux issus de la plaque du toit empêchent les axones commissuraux de pousser dorsalement. À mi-chemin sur l'axe dorso-ventral de la moelle épinière, les axones tournent brusquement, contournent les motoneurones, et se dirigent vers la plaque du plancher sur la ligne médiane ventrale qu'ils traversent (Fig. 12.27 ; voir aussi Fig. 12.9). De l'autre côté de la ligne médiane, les axones commissuraux font un autre virage, et se projettent en avant le long de la moelle épinière vers la tête. Ils ne recroiseront pas la ligne médiane. Les molécules chimioattractantes et chimiorépulsives présentes au niveau de la ligne médiane ventrale, permettent aux axones commissuraux de franchir la ligne médiane et les empêchent aussi de la croiser à nouveau par la suite.

Les axones approchant la ligne médiane de la moelle épinière offrent de bons exemples de l'attraction et de la répulsion à longue distance des cônes de croissance. Les axones des neurones commissuraux de vertébrés sont attirés vers la plaque du plancher au niveau de la ligne médiane ventrale par la Nétrine-1 chimioattractive, qui transduit l'attraction *via* le récepteur DCC. La Nétrine-1 est un attractant clé produit dans la plaque du plancher et sur la ligne médiane. La répression du gène de la Nétrine-1 chez la souris, ou de son récepteur DCC, conduit Fig. 12.27 Le chimiotactisme peut guider les axones commissuraux dans la moelle épinière. Dans la moelle épinière des vertébrés, les axones des neurones commissuraux se dirigent ventralement et bifurquent vers les cellules de la plaque du plancher. Ils franchissent la ligne médiane au niveau de la plaque du plancher et ensuite continuent en avant le long de la moelle épinière. La microphotographie montre une coupe histologique transversale de moelle épinière avec les axones des neurones commissuraux (à l'intérieur de la moelle épinière) marqués en vert et les corps cellulaires en rouge.

Photographie aimablement communiquée par S. Butler. **Fig. 12.28** Effet de l'invalidation du gène *netrin-1* chez la souris. Chez la souris dépourvue de Nétrine-1, les axones commissuraux ne migrent pas vers la plaque du plancher. Barre d'échelle = 0,1 mm.

Microphotographies aimablement communiquées par M. Tessier-Lavigne, reproduites avec l'autorisation de Serafini, T., et al. : **Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system**. Cell 1996, **87 :** 1001-1014. © 1996 Cell Press.





à des voies axonales commissurales anormales (Fig. 12.28). Le mécanisme qui repousse les axones de la ligne médiane implique, chez la drosophile comme chez les vertébrés, la protéine extracellulaire Slit et ses récepteurs Robo sur les cônes de croissance axonaux. Slit est présent au niveau de la ligne médiane, et en se liant aux récepteurs Robo1 et Robo2 sur le cône de croissance, elle exerce un effet chimiorépulsif. Pour les axones commissuraux approchant la ligne médiane chez les vertébrés, l'effet chimiorépulsif de Slit est toutefois dominé par la protéine Robo3 apparentée au récepteur Robo et présente sur le cône de croissance, ce qui interfère avec la signalisation de Slit *via* Robo1 et Robo3 cesse d'être produit et le cône de croissance peut à nouveau être repoussé de la ligne médiane par Slit, ce qui l'empêche de revenir en arrière. Le virage serré vers l'avant réalisé par les axones commissuraux de mammifères après avoir traversé la ligne médiane, pourrait résulter d'un gradient de protéines Wnt diffusant dans la plaque du plancher depuis une source antérieure.

12.18 Les neurones de la rétine établissent des connexions ordonnées avec les centres visuels du cerveau

Une tâche sans doute encore plus complexe pour le système nerveux en développement est de relier les récepteurs sensoriels qui reçoivent des signaux du monde extérieur avec des cibles neuronales dans le cerveau qui permettent de donner un sens à ces signaux. Une caractéristique du cerveau des vertébrés est l'existence de cartes topographiques. Autrement dit, les neurones d'une région donnée du système nerveux ont des projections s'effectuant de façon ordonnée vers une autre région, de

Fig. 12.29 La compétition pour des signaux chimioattractifs et chimiorépulsifs permet aux axones commissuraux à la fois de franchir la ligne médiane et de ne pas revenir

en arrière. Les axones commissuraux sont attirés vers la ligne médiane par la protéine chimioattractive Nétrine (cercle vert) agissant *via* son récepteur DCC (en vert). Lorsque les axones progressent vers la ligne médiane, le niveau de Robo1/2 (en jaune), récepteurs de la protéine chimiorépulsive SIit (diamant jaune), demeure faible. Les cônes de croissance des axones commissuraux commencent à produire le récepteur membranaire Robo3 (en orange) lorsqu'ils approchent la ligne médiane, ce qui inhibe l'effet chimiorépulsif de Slit agissant sur Robo1/2. Une fois que les axones commissuraux s'approchent de la ligne médiane et la franchissent, un épissage alternatif de Robo3 et n'inhibe plus Robo1/2. La répulsion par Slit peut alors empêcher les axones de franchi une nouvelle fois la ligne médiane. La production accrue de Robo1/2 survient après le franchissement de la ligne médiane, et favorise l'inhibition de l'attraction vers la ligne médiane exercée par la Nétrine. Les axones non-commissuraux ne produisent pas Robo3 et sont ainsi en permanence repoussés de la ligne médiane par Slit.



sorte que les relations de proximité sont maintenues. Le système visuel des vertébrés a fait l'objet d'intenses recherches depuis de nombreuses années, et la projection très organisée des neurones de l'œil vers le thalamus ou le tectum, *via* le nerf optique, est l'un des meilleurs modèles disponibles pour montrer comment sont mises en place des projections neuronales de façon topographique. Il y a environ 126 millions de photorécepteurs individuels dans une rétine humaine, et certains animaux avec une excellente vision nocturne, comme les chouettes, en ont encore bien plus. Chacun de ces photorécepteurs enregistre en continu, une infime partie du champ visuel de l'œil, et les signaux doivent être envoyés au cerveau d'une manière ordonnée afin qu'ils puissent être assemblés en une image cohérente. De petits ensembles de photorécepteurs adjacents activent indirectement les neurones individuels, les cellules ganglionnaires de la rétine, dont les axones sortent de l'œil regroupés dans le nerf optique (voir Section 11.27 pour un bref aperçu du développement de l'œil lui-même). Le nerf optique issu de chaque œil humain est constitué de plus d'un million d'axones.

Chez les oiseaux et les amphibiens, le nerf optique relie la rétine à une région du mésencéphale nommée le **tectum** (ou **toit optique**), où sont traités les signaux visuels. Chez les oiseaux et les larves d'amphibiens, le nerf optique de l'œil droit établit des connexions avec le tectum gauche, tandis que le nerf de l'œil gauche fait des connexions sur le côté droit du cerveau, les axones se croisant les uns les autres dans une structure nommée **chiasma optique** (Fig. 12.30, à gauche). Chez les mammifères, la cible principale des axones rétiniens est les **corps genouillés latéraux** (CGL) dans le thalamus, à partir desquels d'autres neurones relaient les signaux jusqu'au **cortex visuel**, dans lequel est réalisé l'essentiel du traitement visuel. Une voie secondaire chez les mammifères va de la rétine au **colliculus supérieur** (formé à partir du mésencéphale comme le tectum aviaire et amphibien), qui intervient principalement en participant à l'orientation des yeux et de la tête suite à une variété de stimuli sensoriels. Comme cette voie fournit une carte plus simple que celle du corps genouillé latéral, elle est souvent étudiée.

Chez la plupart des mammifères et les grenouilles après métamorphose, les axones de la rétine d'un œil ne vont pas, respectivement, tous vers le même CGL et le même tectum. Les axones issus de la région ventro-temporale de rétine projettent en effet sur le CGL du même côté que l'œil (**ipsilatéral**), tandis que les autres axones rétiniens projettent vers le CGL du côté opposé (**controlatéral**) (Fig. 12.30, à droite). Cette séparation des voies se produit au chiasma optique et permet la vision binoculaire chez les mammifères dont les yeux sont orientés vers l'avant, comme les primates, en assurant une continuité de la représentation dans les structures de traitement visuel du cerveau. Les oiseaux, qui sont nombreux également à avoir une excellente vision binoculaire, intègrent par d'autres voies les signaux visuels de chaque œil.

Au chiasma optique, les axones des cellules ganglionnaires de la rétine doivent prendre la décision d'éviter ou de traverser la ligne médiane du cerveau. Le mécanisme

Fig. 12.30 Comparaison des systèmes visuels chez les amphibiens et les

mammifères. À gauche : chez le têtard de grenouille, les neurones de la rétine qui se projettent directement vers le tectum, se croisent au niveau du chiasma optique, avec les neurones de la rétine gauche qui se connectent au tectum droit et ceux de la rétine droite qui rallient le tectum gauche. À droite : chez les mammifères, la voie visuelle principale est destinée au corps genouillé latéral (CGL), à partir duquel un second neurone se projette sur le cortex visuel. Chez les mammifères ayant une vision binoculaire et stéréoscopique complète, les neurones de la rétine temporale se projettent vers le CGL du même côté par rapport à l'œil d'origine, et ceux de la rétine nasale croisent la ligne médiane au niveau du chiasma et se terminent dans le CGL opposé. Dans un souci de clarté, les neurones d'une moitié de rétine seulement sont représentés. N, nasal ; T, temporal ; L, latéral ; M, médian ; A, antérieur ; P, postérieur.

Illustration d'après Goodman, C.S., Shatz, C.J.: Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. Cell Suppl. 1993, **72**: 77-98.



Fig. 12.31 Carte de la rétine sur le tectum. Dans le tectum des amphibiens, les neurones de la rétine dorsale connectent la partie latérale (L) du tectum, et les neurones ventraux connectent le tectum médian. De façon semblable, les neurones de la rétine temporale (T), connectent le tectum antérieur (A) et les neurones de la rétine nasale (N) connectent le tectum postérieur (P).



Fig. 12.32 Les connexions rétino-tectales chez les amphibiens sont rétablies selon l'arrangement originel après lésion du nerf optique et rotation de l'œil. À gauche : les axones des neurones de l'œil gauche connectent avant tout le tectum droit, et ceux de l'œil droit le tectum gauche. Il y a une relation point par point entre les neurones issus des différentes régions de la rétine (nasale (N), temporale (T), dorsale (D) et ventrale (V)), et leur projection dans le tectum (postérieur (p), antérieur (a), latéral (l) et médian (m) respectivement). Au centre et à droite : si un nerf optique est

sectionné chez la grenouille et l'œil retourné de 180°, l'extrémité déconnectée des axones dégénère. Quand les neurones régénèrent, ils établissent de nouvelles connexions sur les sites originels du tectum. Toutefois en raison de la rotation de l'œil, l'image arrivant au tectum est renversée, de haut en bas par rapport à l'image d'origine. Quand la grenouille voit une mouche au-dessus de sa tête, elle l'analyse comme étant en bas et bouge la langue vers le bas pour l'attraper (dessin de droite).

par lequel cela s'accomplit n'est pas clair, mais semble impliquer des molécules de guidage à courte distance, tels que les éphrines et les récepteurs Eph. Chez la souris, par exemple, la projection rétinienne ipsilatérale provient de neurones du croissant ventro-temporal périphérique de la rétine (Fig. 12.30, à droite). Ces neurones produisent le récepteur de guidage EphB1 (voir Encart 9D), qui interagit, au chiasma optique, avec l'éphrine B2 sur les cellules de la glie radiaire pour repousser les axones loin de la ligne médiane et dans le tractus optique ipsilatéral.

Les neurones rétiniens organisent une carte très ordonnée sur leurs structures cibles, avec une correspondance point par point entre un point de la rétine et sa projection sur le tectum. La Figure 12.31 montre comment les neurones à des positions différentes le long de l'axe naso-temporal de la carte rétinienne du têtard se projettent selon une direction inverse le long de l'axe postéro-antérieur du tectum. Une inversion de polarité similaire est observée dans la cartographie des neurones le long de l'axe dorso-ventral de la rétine, les neurones de la rétine dorsale se projetant vers la région latérale du tectum et des neurones de sa région ventrale vers la région médiane du tectum.

Il est à noter que chez certains vertébrés, comme les poissons et les amphibiens, le patron des connexions peut être rétabli avec précision lorsque le nerf optique est coupé. Les axones distaux à la section meurent, de nouveaux cônes de croissance se forment à l'extrémité du segment proximal, et des axones en croissance établissent de nouvelles connexions sur le tectum. Chez la grenouille, même si l'œil est inversé à 180°, les axones reforment leurs projections d'origine (Fig. 12.32). Cependant, les animaux se comportent ensuite comme si leur monde visuel avait été inversé de haut en bas. Si un stimulus visuel, comme une mouche, est présenté au-dessus de l'œil inversé, la grenouille déplace la tête vers le bas au lieu de le faire vers le haut, et ne peut jamais apprendre à corriger cette erreur.

Ces expériences ont évoqué la possibilité que chaque neurone de la rétine porte un identifiant chimique qui permet de le relier de manière fiable avec une cellule appropriée au niveau du tectum. C'est **l'hypothèse de la chimioaffinité** pour la mise en place des connexions. Concernant les projections rétinotectales, on considère qu'un nombre relativement faible de facteurs formant des gradients dans le tectum, fournit une information de position détectable par les axones rétiniens. L'expression spatialement graduée d'un autre ensemble de facteurs sur les axones de la rétine leur fournirait leur propre information de position. Le développement des projections rétinotectales pourrait donc, en principe, résulter des interactions entre ces deux gradients.

Ces gradients ont d'abord été découverts dans le système visuel en développement chez l'embryon de poulet où une activité de guidage axonal basée sur la répulsion



Fig. 12.33 Choix de la cible par les

axones rétiniens. Si des fragments de rétine temporale sont disposés au contact d'un « tapis » constitué de bandes alternées de membranes de tectum postérieur et antérieur de 90 µm de large, les cellules ganglionnaires envoient des axones uniquement sur les membranes du tectum antérieur. **Fig. 12.34 Expression complémentaire des éphrines et de leurs récepteurs dans la projection rétino-colliculaire chez la souris**. Le colliculus supérieur est une structure du mésencéphale des mammifères recevant quelques projections de la rétine, et est analogue au tectum des amphibiens ou des oiseaux. Le récepteur des éphrines A est le récepteur EphA, récepteur à tyrosine kinase. Les neurones de la rétine temporale qui produisent de grandes quantités de EphA à leur surface, sont repoussés du colliculus postérieur où est présent un taux élevé d'éphrines A, mais peuvent établir des contacts dans le colliculus antérieur. Les neurones de la rétine nasale qui produisent de faibles taux de EphA, établissent des contacts dans le colliculus postérieur, n'étant repoussés que par des taux très élevés d'éphrines.

a été détectée le long de l'axe antéro-postérieur du tectum. Normalement, la moitié temporale de la rétine se projette sur la partie antérieure du tectum, et la moitié nasale se projetant sur le tectum postérieur. Les axones temporaux d'un explant de rétine de poulet, lorsqu'ils ont le choix de croître sur des membranes de cellules tectales postérieures ou antérieures, montrent une préférence pour les membranes de cellules tectales antérieures (Fig. 12.33). Ce choix est régi par la répulsion des axones, comme le montre l'effondrement de leurs cônes de croissance, à un facteur situé à la surface des cellules tectales postérieures. Les éphrines et leurs récepteurs, exprimés selon des gradients réciproques dans la rétine et le tectum, sont des molécules susceptibles d'orchestrer cette répulsion.

Chez la souris, le rôle du couple éphrines/Eph dans la genèse d'une carte a été étudiée dans la voie rétino-colliculaire, où le patron de cette carte est imposé selon l'axe antéro-postérieur, par les interactions répulsives entre les récepteurs de la famille EphA et leurs ligands, les éphrines A. La cartographie de la rétine sur le colliculus supérieur est similaire à celle décrite pour le tectum : les neurones des rétines nasale et temporale envoient leurs axones sur les colliculi postérieur et antérieur, respectivement. Les récepteurs EphA sont produits dans la rétine de souris suivant un gradient croissant naso-temporal, alors que les éphrines A sont produites suivant un gradient décroissant antéro-postérieur dans le colliculus. Ainsi les neurones rétiniens avec de nombreux récepteurs EphA contactent des cibles colliculaires ayant le plus faible taux d'éphrines A. Les axones rétiniens porteurs d'un faible taux de récepteurs se dirigent vers les zones produisant des niveaux élevés de ligands, tandis que les axones rétiniens porteurs de taux élevés de récepteurs sont arrêtés avant qu'ils n'atteignent les zones produisant des taux élevés d'éphrines A (Fig. 12.34). Une explication possible à ce comportement est que la liaison du ligand à son récepteur envoie un signal répulsif, et l'axone cesse de s'étendre lorsque ce signal atteint une valeur seuil. La force du signal reçu par l'axone en migration est proportionnelle au produit des concentrations du récepteur et du ligand. Ainsi, le seuil sera atteint pour un niveau élevé à la fois du récepteur et de son ligand, mais pas pour un niveau faible de récepteur, même en présence d'un niveau élevé de ligand.

La cartographie des projections axonales entre l'axe dorso-ventral de la rétine et l'axe médio-latéral du colliculus supérieur ou du tectum, repose également sur l'expression graduée du couple Eph/éphrines. Dans ce cas, les neurones de la rétine ventrale produisent un taux élevé d'EphB et ceux de la rétine dorsale un taux faible, alors que le taux de l'éphrine B est élevé sur le tectum médian et faible en latéral. Les interactions EphB et éphrine B déterminent des interactions d'adhérence et d'attraction plutôt que de répulsion, ce qui pose un problème conceptuel. Si leurs interactions étaient le seul facteur en jeu, tous les neurones de la rétine seraient attirés par la région du tectum produisant le taux le plus élevé d'éphrine B, au lieu de se projeter en fait dans tout le tectum. Dans ce cas, des interactions nécessairement répulsives semblent être fournies par des gradients de la protéine de signalisation Wnt3 dans le tectum et un récepteur Ryk sur les axones rétiniens.

RÉSUMÉ

Les cônes de croissance à l'extrémité de l'axone guident la progression de celui-ci vers sa cible. L'activité des filopodes du cône de croissance est influencée par des facteurs environnementaux, tels que des contacts avec le substrat et d'autres cellules. Le guidage peut également reposer sur le chimiotactisme, et impliquer à la fois des



mécanismes d'attraction et de répulsion. Dans le développement des motoneurones qui innervent les muscles des membres des vertébrés, les cônes de croissance guident les axones afin d'établir des connexions spécifiques avec le muscle approprié, même lorsque leur site normal d'entrée dans le membre est modifié. Les combinaisons de facteurs de transcription donnent à chaque motoneurone une identité qui détermine ses projections. L'attraction et la répulsion contrôlent le franchissement de la ligne médiane par les axones, à la fois chez la drosophile et les vertébrés. Des gradients de facteurs diffusibles sont probablement responsables de la croissance directionnelle des axones commissuraux dans la moelle épinière. Le guidage neuronal des axones de la rétine pour l'établissement des bonnes connexions dans le tectum implique des gradients de molécules à la surface cellulaire à la fois sur les neurones tectaux et sur les axones de la rétine, ce qui peut stimuler ou empêcher l'approche du cône de croissance. Il existe aussi une compétition entre les neurones pour des sites cibles.



Formation et raffinement des synapses

L'aboutissement de la navigation axonale ayant été décrit, il reste à se concentrer sur les connexions spécialisées, les synapses, que les axones élaborent avec leurs cibles et qui sont essentielles pour la signalisation entre les neurones et leurs cellules cibles. La formation des synapses selon le patron prévu est l'exigence de base de tout système nerveux en développement. Les connexions peuvent être établies avec d'autres cellules nerveuses, avec des muscles, et aussi avec certains tissus glandulaires. Seront abordés ici principalement le développement et la stabilisation des synapses au niveau des jonctions entre les motoneurones et les cellules musculaires chez les vertébrés, qui sont appelées **jonctions neuromusculaires** (Fig. 12.35) et qui constituent un modèle pour la compréhension de la formation des synapses. Il existe de très nombreux types de neurones, des centaines voire des milliers, et une question centrale concerne leur mode d'appariement pour établir des synapses de façon fiable. Les mécanismes moléculaires de ce processus commencent seulement à être connus.

La mise en place d'un système nerveux complexe chez les vertébrés implique d'affiner une organisation au départ assez imprécise au moyen d'une importante mort cellulaire programmée (voir Encadré 6A). L'établissement d'une connexion entre un neurone et sa cible semble être essentiel non seulement pour le fonctionnement du système nerveux, mais aussi pour la survie même de nombreux neurones. La mort neuronale est très courante dans le système nerveux des vertébrés en développement, un nombre excessif de neurones étant produit initialement, et seuls survivent les neurones qui établissent des connexions appropriées. La survie dépend de la réception par le neurone de **facteurs neurotrophiques** ou **neurotrophines** comme le facteur de croissance nerveuse ou NGF (pour *Nerve Growth factor*), qui sont produits par le tissu cible et pour lesquel les neurones sont en compétition.


Une particularité du développement du système nerveux est que l'ajustement précis des connexions synaptiques dépend de l'interaction de l'organisme avec son environnement et de l'activité neuronale qui en résulte. Cela est particulièrement vrai du système visuel des vertébrés, où, dans une période immédiatement après la naissance, l'influx sensoriel issu de la rétine modifie les connexions synaptiques pour que l'animal perçoive les petits détails. À nouveau, ce raffinement semble impliquer une compétition pour les neurotrophines. Ce sujet sera traité après avoir considéré la formation des synapses. Fig. 12.35 Structure de la jonction neuromusculaire des vertébrés. L'axone du motoneurone, recouvert d'une gaine de myéline constituée par des cellules de Schwann, innerve la cellule musculaire. Au niveau de la jonction neuromusculaire, les axones s'arborisent dans la région de la plaque motrice, et établissent des contacts synaptiques avec la membrane des cellules musculaires. La communication entre le nerf et le muscle se fait via l'acétylcholine, neurotransmetteur libéré par les vésicules synaptiques dans la fente synaptique. L'acétylcholine diffuse à travers la fente et se fixe sur des récepteurs cholinergiques de la membrane de la cellule musculaire.

Illustration d'après Kandell, E.R., et al. : Principles of Neural Science, 3rd edition. New York : Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1991. Fig. 12.36 Développement de la jonction neuromusculaire. Avant d'être contactés par un axone les récepteurs cholinergiques (AChR) sont regroupés dans la région centrale de la cellule musculaire. Quand le cône de croissance de l'axone d'un motoneurone entre en contact avec une cellule musculaire, il libère le protéoglycanne Agrine (flèche bleue) dans le matériel extracellulaire. L'Agrine se lie et active la kinase de la cellule musculaire MuSK (pour Muscle-cell kinase), qui à son tour maintient l'amas d'AChR dans la membrane de la cellule musculaire, et la spécialisation de la surface postsynaptique. Un signal (encore inconnu) de la cellule musculaire (flèche violette), favorise alors la différenciation de la terminaison présynaptique, avec la formation de vésicules synaptiques. La signalisationn synaptique par l'acétylcholine (petits cercles rouges) libérée par les vésicules synaptiques peut alors commencer.



12.19 La formation des synapses repose sur des interactions réciproques

La formation des synapses va d'abord être décrite avec la jonction neuromusculaire. La jonction neuromusculaire mature est une structure complexe impliquant une modification importante de la terminaison nerveuse et de la membrane des cellules musculaires (voir Fig. 12.35). Juste avant la jonction, les terminaisons des axones se ramifient de façon entrelacée. Chaque ramification se termine par une dilatation qui est en contact avec une région particulière de la plaque motrice de la fibre musculaire. La membrane plasmique de l'axone est séparée de celle de la cellule musculaire par une fente étroite (la **fente synaptique**) remplie d'éléments extracellulaires sécrétés tant par le neurone que la cellule musculaire. Une lame basale constituée d'éléments de la matrice extracellulaire est présente autour de la surface de la cellule musculaire. La synapse comprend les membranes plasmiques de l'axone et de la cellule musculaire opposée, et la fente située entre elles.

Les signaux électriques ne peuvent pas franchir la fente synaptique, et pour que le neurone envoie un signal au muscle, l'influx électrique qui se propage le long de l'axone est transformé au niveau de la terminaison en un signal chimique. C'est un neurotransmetteur chimique qui est libéré dans la fente synaptique à partir des vésicules synaptiques de la terminaison axonale. Les molécules du neurotransmetteur diffusent à travers la fente et interagissent avec des récepteurs situés sur la membrane des cellules musculaires, ce qui provoque la contraction de la fibre musculaire. Le neurotransmetteur utilisé par les motoneurones contactant les muscles squelettiques est l'acétylcholine. En raison de la propagation du signal du nerf au muscle, la terminaison de l'axone constitue l'élément **pré-synaptique** de la jonction et la cellule musculaire en est l'élément **post-synaptique** (Fig. 12.35). Le cône de croissance de l'axone en développement devient la terminaison pré-synaptique.

Le développement d'une jonction neuromusculaire est progressif. Avant l'arrivée de l'axone il y a déjà une ébauche d'un patron sur le muscle, avec des récepteurs de l'acétylcholine concentrés dans la zone centrale de la cellule musculaire. Lorsque les terminaisons du motoneurone arrivent, elles délivrent dans la lame basale un protéoglycanne, l'Agrine. Celui-ci se fixe, en l'activant, sur à la kinase transmembranaire spécifique du muscle MuSK, dont l'activité est nécessaire pour maintenir le regroupement des récepteurs de l'acétylcholine et la spécialisation de la surface des cellules musculaires sur le site (Fig. 12.36). Les signaux issus du muscle induisent à leur tour une différenciation de la zone pré-synaptique de la terminaison axonale et alignent cette zone avec la région post-synaptique du muscle. Ces signaux ne sont pas encore clairement identifiés, mais la Laminine β_{3} , une glycoprotéine présente dans la lame basale, est nécessaire pour un alignement correct et une différenciation pré-synaptique complète. Le facteur de croissance Neuréguline-1, qui est apparenté au facteur de croissance épidermique et qui agit par l'intermédiaire des récepteurs ErbB, est nécessaire pour la formation de certaines synapses, dont les jonctions neuromusculaires, où il participe à la présence des récepteurs de l'acétylcholine au niveau la membrane musculaire.

La Neuréguline-1 est également impliquée dans le développement des cellules gliales, dont les cellules de Schwann du système nerveux périphérique. Chez les vertébrés, l'influx nerveux doit souvent parcourir de longues distances le long des axones



Fig. 12.37 Formation d'une synapse interneuronale. Une dendrite émet des filopodes qui contactent le cône de croissance d'un axone. Une signalisation réciproque, assistée de molécules d'adhérence (flèches rouges) initie la formation de la synapse. Dans l'axone, des protéines formant la zone pré-synaptique active, se regroupent au site de contact avec les précurseurs des vésicules synaptiques. Dans la dendrite, les récepteurs du neurotransmetteur sont synthétisés

et portés à la membrane post-synaptique avec les protéines d'échafaudage synaptique. La connexion synaptique se développe en une épine dendritique typique.

Illustration d'après Li, Z., Sheng, M. : **Some assembly required : the** *development of neuronal synapses*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2003*, **4 :** 833–841.

des nerfs périphériques, jusqu'à plusieurs mètres chez les animaux de grande taille, et la propagation rapide de l'influx nerveux sur de telles distances est atteinte grâce à la myélinisation des axones par les cellules gliales. Les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique et les oligodendrocytes dans le système nerveux central, s'enroulent autour des axones de telle sorte que leurs membranes cellulaires forment une couche lipidique de myéline isolante. Les lignes de courant traversent alors la membrane axonale uniquement en ses zones dénudées entre un segment isolé et le suivant, et l'influx nerveux est capable de « sauter » d'une zone dénudée à la suivante sans perte de signal. La perte progressive de la fonction neuronale dans la sclérose en plaques, maladie humaine due à l'altération de la myéline, conduit finalement à une faiblesse musculaire sévère en raison de la réduction du signal du nerf au muscle.

La jonction neuromusculaire est un type de synapse très spécialisé. La formation des synapses du vaste réseau de neurones que forme le système nerveux central suit cependant des principes similaires. Les synapses s'établissent entre la terminaison axonale d'un neurone et une dendrite, le corps cellulaire, ou plus rarement l'axone d'un autre neurone. Un motoneurone individuel dans la moelle épinière, par exemple, recevra des influx de nombreux autres neurones sur ses dendrites et son corps cellulaire. Comme pour les jonctions neuromusculaires, la formation des synapses entre les neurones est susceptible d'impliquer une signalisation réciproque entre l'axone et la dendrite. Les synapses entre les neurones peuvent se former très rapidement, sur une échelle de temps d'environ une heure, et les observations suggèrent que des filopodes de la dendrite initient la formation des synapses en atteignant l'axone (Fig. 12.37). Les signaux provenant de l'axone, comprenant la libération d'un neurotransmetteur, peuvent en premier guider le filopode de la dendrite. Les nombreux autres facteurs décrits comme favorisant la formation des synapses, incluent des molécules d'adhérence cellulaire et des molécules de la signalisation Wnt. Les molécules d'adhérence cellulaire impliquées dans la formation des synapses comprennent les neuroligines, protéines de la membrane post-synaptique qui se lient à des protéines sur la surface axonale présynaptique, nommées β -neurexines. Conduisant au regroupement des neurexines, elles induisent une différenciation de la terminaison présynaptique. Les neuroligines favorisent la fonction des synapses excitatrices plutôt que des synapses inhibitrices. Les cadhérines, les protocadhérines, et des membres de la superfamille des immunoglobulines (voir Encart 9A) ont également été localisées au niveau des synapses et confèrent ainsi leur spécificité. Des défauts dans la formation ou la plasticité des synapses contribueraient significativement à l'autisme et aux troubles du spectre autistique (Encart 12D).



Fig. 12.38 La mort neuronale est un processus normal du développement dans la moelle épinière de poulet. Le nombre de motoneurones de la moelle épinière innervant le membre du poulet diminue d'environ de moitié avant l'éclosion, conséquence de la mort programmée au cours du développement. La plupart des neurones meurent sur une période de quatre jours.

ENCART 12D L'autisme : un trouble du développement qui implique un dysfonctionnement synaptique

Le cerveau fonctionne grâce à la libération de molécules de neurotransmetteurs au niveau de synapses interconnectant les neurones en réseaux très complexes. La formation correcte et le raffinement des synapses au cours du développement sont ainsi d'une importance cruciale pour les fonctions cognitives. L'autisme est un trouble courant et envahissant (1 sur environ 120 naissances vivantes) d'origine développementale qui se caractérise par des déficits dans la communication et les interactions sociales avec des comportements répétitifs et une restriction des intérêts.

Les études de génétique humaine ont identifié des centaines de gènes qui, lorsqu'ils sont mutés ou présents en un nombre anormal de copies, sont associés à l'autisme. Une grande proportion de ces gènes agit dans les voies de développement qui convergent sur la fonction des synapses, les gènes mutants interférant avec la formation des synapses et/ou avec l'homéostasie synaptique, gestion à l'échelle cellulaire de l'activité synaptique pour maintenir un équilibre approprié entre l'excitation et l'inhibition. Parmi ces gènes, ceux codant les protéines situées au niveau de la synapse même prédominent, dont certaines sont connues pour être impliquées dans la neurotransmission, d'autres dans l'adhérence cellule-cellule. Les neurexines par exemple, et leurs partenaires les neuroligines (voir Section 12.19), sont des protéines d'adhérence cellulaire synaptiques avec un rôle crucial dans la synaptogenèse, et pourraient moduler également la neurotransmission de façon plus spécifique en agissant comme récepteurs (Figure 1). Elles sont fréquemment mutées dans l'autisme. La protéine d'échafaudage SHANK3 se trouve sur la membrane post-synaptique des neurones excitateurs, où elle est associée aux neuroligines et aux récepteurs glutamatergiques NMDAR et mGluR via les protéines adaptatrices GKAP, PSD-95, et Homer. Des mutations du gène SHANK3 sont également fréquentes dans l'autisme.

Bien que la génétique de l'autisme soit complexe, plusieurs troubles humains monogéniques avec une hérédité mendélienne présentent un phénotype autistique. Une forme commune de déficit intellectuel, le syndrome de l'X fragile par exemple, est causée par des mutations sur le gène *FMR1*. Celui-ci code un suppresseur de traduction FMRP, qui cible les ARNm de plusieurs gènes codant des protéines synaptiques qui régulent la plasticité synaptique. La perte de ces protéines affecte en particulier la dépression synaptique dépendant des mGluR (Figure 1), processus d'affaiblissement de la puissance synaptique essentiel à l'apprentissage et à la mémoire, et qui agit conjointement à d'autres processus complémentaires de renforcement synaptique, ou potentialisation à long terme.



Figure 1

Le syndrome de Rett est un trouble neurodéveloppemental sévère lié à l'X, souvent associé à des comportements autistiques, qui entraîne presque toujours des mutations dans le gène MeCP2 codant une protéine de liaison à la méthylcytosine. La souris knock-out pour MeCP2 présente un phénotype de Rett typique, incluant une fonction motrice anormale, des tremblements, une épilepsie et une spasticité des membres postérieurs. Il est à noter que la réactivation subséquente de MeCP2 chez les animaux jeunes peut conduire à la résolution des anomalies. Ceci suggère que la présence de la protéine MeCP2 serait nécessaire uniquement aux stades de développement du système nerveux dépendant de l'activité, au cours desquels le câblage du cerveau peut subir une plasticité synaptique considérable. Fait intéressant, le traitement de la souris knock-out MeCP2 avec le facteur de croissance apparenté à l'insuline, l'IGF-1, conduit également à l'inversion de nombreux aspects du phénotype, y compris les anomalies synaptiques. Des cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS, voir Encart 8D) dérivées de patients atteints du syndrome de Rett, chez lesquelles MeCP2 est réprimé, ont été induites en culture à se différencier en neurones, fournissant un moyen d'étude du syndrome in vitro. Les neurones présentent des anomalies synaptiques, en particulier des perturbations de l'équilibre entre excitation et inhibition. Comme chez les souris mutantes, l'application d'IGF-1 à ces neurones dérivés de cellules iPS, remédie à la réduction du nombre de synapses excitatrices, rendant plus proche la possibilité d'une thérapie moléculaire efficace.

Chez la drosophile, la molécule d'adhérence cellulaire Dscam, membre de la superfamille des immunoglobulines, est nécessaire à la fois pour le guidage des axones dans le système nerveux embryonnaire et pour la spécification des connexions neuronales. Elle déclenche une voie de signalisation qui conduit à l'activation de GTPases de la famille Rho qui affectent la migration axonale en provoquant des changements dans le cytosquelette d'actine. Le gène *Dscam* est exceptionnel dans le sens où l'épissage alternatif pourrait produire environ 38 000 formes distinctes de récepteurs à la surface cellulaire, augmentant ainsi la possibilité que différentes formes de la protéine puissent être produites dans des neurones différents.

12.20 Beaucoup de motoneurones meurent au cours d'un développement normal

Quelque 20 000 motoneurones sont formés dans la partie de la moelle épinière qui innerve la patte chez le poussin au cours du développement, mais environ la moitié d'entre eux vont mourir peu après leur formation (Fig. 12.38). La mort cellulaire se produit après la croissance des axones à partir du corps cellulaire et leur entrée dans le membre, à peu près au moment où les terminaisons axonales atteignent leurs cibles potentielles, les muscles squelettiques du membre. Deux expériences suggèrent le rôle des muscles cibles dans la prévention de la mort cellulaire. L'ablation du bourgeon du membre diminue fortement le nombre de motoneurones survivants, alors que celui-ci est augmenté après la transplantation d'un bourgeon de membre supplémentaire au même niveau que le membre, fournissant des cibles addition-nelles pour les axones.

La survie d'un motoneurone dépend des contacts qu'il établit avec une cellule musculaire. Une fois un contact établi, le neurone peut exciter le muscle, ce qui est suivi par la mort d'une partie des autres motoneurones qui approchent la cellule musculaire. L'excitation des muscles par les neurones peut être bloquée par des drogues empêchant la transmission de l'influx neuromusculaire, comme le curare, ce qui se traduit par une augmentation importante du nombre de motoneurones qui survivent.

Certaines connexions neuro-musculaires peuvent être éliminées même une fois établies. Aux stades précoces du développement, les cellules musculaires individuelles sont innervées par des terminaisons axonales issues de plusieurs motoneurones différents. Avec le temps, la plupart de ces contacts sont éliminés, jusqu'à ce que chaque cellule musculaire soit innervée par les terminaisons axonales d'un seul motoneurone (Fig. 12.39). Ceci est dû à une compétition entre les synapses, les synapses présentant une transmission synaptique plus élevée déstabilisant celles présentant une transmission plus faible sur une même cible. Ce processus d'élimination, et la maturation d'une jonction neuromusculaire stable prennent jusqu'à 3 semaines chez le rat.

Ces mécanismes font correspondre parfaitement le nombre de motoneurones au nombre de cibles appropriées, ce qui suggère, pour le développement de la connectivité du système nerveux, un mécanisme général à toutes les parties du système nerveux des vertébrés. Des neurones sont ainsi générés en excès, et seuls ceux qui établissent les connexions requises sont sélectionnés pour survivre. Ce mécanisme est bien adapté pour réguler le nombre de cellules en faisant correspondre la taille de la population neuronale à ses cibles. Maintenant vont être abordés plus en détail les facteurs neurotrophiques qui favorisent la survie des neurones, avant d'examiner le rôle de l'activité neuronale dans l'élimination des synapses neuromusculaires.

12.21 La mort et la survie des neurones impliquent à la fois des facteurs intrinsèques et extrinsèques

La mort neuronale au cours du développement a lieu à la suite de l'activation de la voie apoptotique (voir Encart 6A). L'apoptose peut être déclenchée, ou empêchée, soit par un programme de développement intrinsèque soit par des facteurs externes. Dans le développement du nématode par exemple, des neurones particuliers et d'autres cellules, sont intrinsèquement programmés pour mourir (voir Chapitre 6), et la spécificité de la mort cellulaire peut être sous contrôle génétique.

Comme il a été vu dans l'Encart 6A, les membres de la famille de protéines Bcl-2 contrôlent la voie apoptotique chez les vertébrés, certains agissant pour promouvoir l'apoptose et d'autres pour l'empêcher. Bax est un membre clé de cette famille favorisant l'apoptose neuronale au cours du développement. Des souris mutantes pour Bax ont un nombre accru de motoneurones. Une protéine nommée la Survivine inhibe l'apoptose au cours de la neurogenèse précoce. Les souris mutantes chez lesquelles le gène *Survivin* est supprimé à partir du jour embryonnaire 12,5, naissent avec un cerveau plus petit que la normale et avec de nombreux foyers d'apoptose dans le cerveau et la moelle épinière. Elles meurent peu après la naissance.

Dans de nombreuses situations du développement, il semble que les cellules sont programmées pour mourir, à moins de recevoir des signaux de survie spécifiques. Des facteurs extracellulaires jouent un rôle clé dans la survie neuronale chez les vertébrés.



Fig. 12.39 Raffinement de l'innervation du muscle par l'activité neuronale. Au début, plusieurs motoneurones innervent la même cellule musculaire. L'élimination des synapses signifie que chaque cellule est finalement innervée par un seul neurone.

Illustration d'après Goodman, C.S., Shatz, C.J. : Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. Cell Suppl. 1993, **72** : 77-98.





Fig. 12.40 Mise en évidence des colonnes de dominance oculaire dans le cortex visuel de singe. Un traceur radioactif est injecté dans un œil, à partir duquel il est transporté vers le cortex visuel par les neurones. Le traceur injecté à la naissance se distribue de façon étendue sur le cortex. Le traceur injecté à des temps plus tardifs se limite à des colonnes alternées de cellules corticales (bandes plus claires) représentant les colonnes de dominance oculaire pour chacun des yeux, telles qu'elles apparaissent sur la microphotographie. Barre d'échelle = 1 mm.

Illustration d'après Kandel, E.R., et al. : Essentials of Neural Science and Behavior. Norwalk, Connecticut : Appleton & Lange, 1991. Le premier identifié fut le NGF, dont la découverte est due à l'observation fortuite d'une tumeur de souris implantée dans un embryon de poulet provoquant la croissance extensive des fibres nerveuses vers la tumeur. Cela suggérait que la tumeur avait produit un facteur favorisant la croissance axonale. Ce facteur fut finalement identifié comme étant une protéine, le NGF, en utilisant un test *in vitro* de croissance axonale. Le NGF est nécessaire à la survie d'un certain nombre de types neuronaux, en particulier ceux des systèmes nerveux sensoriels et sympathiques.

Le NGF est un membre d'une famille de protéines nommées neurotrophines. Différents types de neurones requièrent des neurotrophines pour leur survie, et le besoin de certaines d'entre elles change également au cours du développement. Le facteur neurotrophique GDNF, par exemple, empêche la mort des motoneurones du nerf facial et est produit par ailleurs dans les bourgeons de membres en développement. De plus en plus d'éléments indiquent que des facteurs neurotrophiques particuliers agissent sur une gamme de types neuronaux.

12.22 Les projections rétinotopiques du cerveau sont affinées par l'activité neuronale

Le développement et la fonction du système nerveux dépendent non seulement de la formation des synapses, mais aussi du démantèlement régulé de connexions synaptiques précédemment fonctionnelles. Il a été vu comment les axones de la rétine établissent des contacts avec le tectum pour constituer une carte rétino-tectale. Cette carte a d'abord une définition plutôt grossière, puisque les axones de cellules voisines dans la rétine établissent des contacts dans une zone tectale étendue. Cette zone est beaucoup plus étendue aux stades précoces du développement, que plus tard, quand la carte rétino-tectale est devenue plus précise. La précision de la carte résulte, comme dans le muscle, du retrait des terminaisons axonales de la plupart des contacts initiaux, et repose sur l'activité neuronale. Cette nécessité est particulièrement visible dans le développement des connexions visuelles chez les mammifères. Si un mammifère, dont l'espèce humaine, est privé de vision pendant une période critique, alors il sera atteint d'un déficit d'acuité visuelle et ne sera pas en mesure de détecter les détails fins.

Chez les mammifères ayant une vision binoculaire et stéréoscopique comme les singes et les humains, les axones rétiniens contactent tout d'abord le corps genouillé latéral où ils établissent des connexions topographiquement organisées. L'influx issu de la moitié nasale de chaque œil est envoyé vers le cerveau du côté opposé, tandis que l'influx issu de la moitié temporale est envoyé vers le cerveau du même côté (Fig. 12.30, figure de droite).

Dans le corps genouillé latéral comme dans le cortex, les neurones sont disposés en couches. Chaque couche reçoit l'influx nerveux des axones rétiniens issus de l'œil droit ou gauche, mais pas des deux, maintenant ainsi séparés les influx des yeux droit et gauche. Les neurones du corps genouillé latéral envoient ensuite des axones vers le cortex visuel (voir Fig. 12.30, à droite). Quand il y a un stimulus visuel, les influx des axones rétiniens activent des neurones du corps genouillé latéral, qui activent alors les neurones de la région correspondante dans le cortex visuel. Le cortex visuel adulte comprend six couches de cellules, la couche 4, recevant les nombreux axones du corps genouillé latéral. Les couches dans le corps genouillé latéral qui reçoivent des influx de la gauche ou de la droite, établissent ensemble des connexions avec la couche 4 du cortex visuel. Cela signifie que l'information issue de positions correspondantes au niveau des deux yeux et qui émane de la même partie du champ visuel, arrive finalement au même endroit dans le cortex (Fig. 12.30, à droite).

À la naissance, les terminaisons nerveuses issues de chacun des deux yeux se recouvrent et se mélangent à leur emplacement final, mais avec le temps, les influx des yeux gauche et droit se séparent en blocs de cellules corticales d'environ 0,5 mm de large, nommés **colonnes de dominance oculaire** (Fig. 12.40). Des colonnes adjacentes répondent au même stimulus dans le champ visuel, une colonne répondant à des signaux issus de l'œil gauche, l'autre de l'œil droit. Cette disposition permet une bonne vision binoculaire et stéréoscopique. Les colonnes peuvent être détectées et cartographiées grâce aux enregistrements électrophysiologiques. Elles peuvent également être mises en évidence directement, en injectant dans un œil un traceur radioactif tel que la proline. Le traceur est incorporé par les neurones de la rétine, transporté par le nerf optique jusqu'au corps genouillé latéral, et de là vers le cortex visuel, où

sa présence peut être détectée par radioautographie. Celle-ci révèle un arrangement spectaculaire en bandes représentant l'influx d'un œil (voir Fig. 12. 40).

L'activité neuronale et l'influx visuel sont essentiels pour le développement et le maintien des colonnes de dominance oculaire. Alors que l'influx sensoriel est important, l'activité spontanée joue également un rôle clé. La formation initiale des bandes chez les primates non-humains se produit avant l'expérience visuelle, et implique des vagues de potentiels d'action apparaissant de façon spontanée dans la rétine des mammifères. Ces ondes peuvent engendrer leurs effets grâce à la libération de neurotrophines qui peuvent remodeler les connexions synaptiques. Si, au cours du développement, l'activité neuronale est bloquée par l'injection de la tétrodotoxine (un bloquant du canal sodique voltage-dépendant), les colonnes de dominance oculaire ne se développent pas, et, dans le cortex visuel, les influx issus des deux yeux restent mélangés. Si l'influx d'un œil est bloqué, dans le cortex visuel le territoire occupé par l'influx de l'autre œil se développe au détriment de l'œil bloqué. La libération du neurotransmetteur inhibiteur, l'acite γ -aminobutyrique (GABA), est nécessaire pour initier la période critique.

La compétition entre les axones afférents constitue une explication plausible pour la formation des colonnes de dominance oculaire (Fig. 12.41). La carte étant établie par les connexions initiales, des neurones corticaux peuvent recevoir, d'abord, un influx des deux yeux. Dans une région donnée, il y aura donc un recouvrement des influx provenant des deux yeux, et le problème issu de ce recouvrement doit être résolu. Les cellules adjacentes qui reçoivent un influx du même œil, ont tendance à être activées simultanément en réponse à un stimulus visuel, ce qui leur permet, dans le cas où elles innervent la même cible, de s'associer pour l'exciter. Comme pour les muscles, la stimulation de l'activité électrique de la cellule cible tend à renforcer les synapses qui sont actives en même temps et supprimer celles qui ne le sont pas, un lien se créant entre les cellules qui déchargent en même temps. Comme il y a compétition entre les neurones vis-à-vis de leurs cibles, ceci pourrait générer des régions discrètes de cellules corticales répondant uniquement à un des deux yeux, et formant ainsi les colonnes de dominance oculaire. Un tel mécanisme explique pourquoi l'exposition expérimentale d'animaux à l'éclairage continu stroboscopique après la naissance, qui provoque l'activation simultanée des neurones correspondant aux deux yeux, empêche la formation de colonnes de dominance oculaire.

Chez la grenouille, le tectum ne reçoit normalement pas d'influx des deux yeux jusqu'à la fin de la morphogenèse et, dans des conditions normales, les colonnes de dominance oculaire ne se développent pas dans le tectum. Toutefois la greffe de l'ébauche d'un troisième œil dans l'embryon conduit, au cours du développement, à des tecta recevant des influx à partir des deux yeux. Les axones rétiniens des deux yeux se séparent ensuite dans le tectum et forment des bandes alternées qui ressemblent au patron des colonnes de dominance oculaire du chat et des primates. Dans ces tecta, les dendrites de certains types de neurones tectaux semblent répondre aux bordures de la bande, comme en témoignent les changements marqués dans leur direction normale de migration ou leur terminaison à la bordure d'une bande. Le comportement des neurones dans cette situation artificielle est une preuve supplémentaire que chez tous les vertébrés, non seulement les mammifères, des interactions très localisées entre les terminaisons axonales afférentes et les dendrites post-synaptiques avec lesquels ils se connectent, sont essentielles pour produire le patron d'un cortex organisé topographiquement.

Un mécanisme possible pour affiner les connexions en réponse à l'activité neuronale, implique la libération locale de neurotrophines. Un certain niveau d'activation, ou l'activation simultanée de deux axones, pourrait induire la libération de neurotrophines par les cellules cibles, et seuls les axones ayant été récemment actifs pourraient être en mesure d'y répondre. Chez les embryons de poulet ou d'amphibiens, le blocage de l'activité neuronale avec des substances chimiques qui s'opposent à la décharge neuronale, empêche le développement d'une définition fine de la carte rétino-tectale.

RÉSUMÉ

Les neurones communiquent entre eux et avec des cellules cibles, comme les muscles, via des jonctions spécialisées, les synapses. Une fois le contact établi, la formation d'une jonction neuromusculaire requiert des changements dans les deux membranes,



Fig. 12.41 Développement des colonnes de dominance oculaire. Au début les neurones du corps genouillé latéral, représentant des projections de chacun des deux yeux et stimulés par le même stimulus visuel, se projettent vers la même région du cortex visuel. (Seule la projection sur l'aire 4 est représentée ici). Avec la stimulation visuelle, les connexions nerveuses se séparent en colonnes, chacune d'elles représentant l'innervation d'un seul œil. Si la stimulation par la vision est interrompue, les colonnes de dominance ne se forment pas.

Illustration d'après Goodman, C.S., Shatz, C.J. : Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. Cell Suppl. 1993, 72 : 77-98. pré-synaptique (neuronale) et post-synaptique (cellule musculaire), et dépend de la signalisation réciproque entre le muscle et le neurone. Des interactions réciproques ont également lieu lors de la formation des synapses entre les axones et les dendrites, où interviennent des molécules d'adhérence cellulaire. Au début, la plupart des fibres musculaires de mammifères sont innervées par deux ou plusieurs axones moteurs, mais, l'activité nerveuse conduisant à la compétition entre les synapses, une cellule est finalement innervée par un seul motoneurone. De nombreux neurones générés dans le système nerveux en développement meurent. La moitié environ des motoneurones qui innervent initialement le membre chez les vertébrés subit la mort cellulaire, la survie de ceux qui subsistent étant due à leurs connexions fonctionnelles avec les muscles. Pour leur survie de nombreux neurones dépendent de neurotrophines comme le NGF, différentes classes de neurones nécessitant différents facteurs neurotrophiques. Non seulement l'assemblage, mais aussi le démantèlement régulé des synapses sont indispensables au fonctionnement du cerveau. L'activité neuronale a un rôle majeur dans le raffinement des connexions entre l'œil et le cerveau. Chez les mammifères, l'influx des yeux droit et gauche est nécessaire au développement des colonnes de dominance oculaire dans le cortex visuel. Celles-ci sont des colonnes adjacentes de cellules répondant au même stimulus à partir des yeux gauche et droit, respectivement. La formation des colonnes, essentielle pour la vision binoculaire, résulte de la compétition pour les cibles corticales entre axones véhiculant un influx visuel issu d'yeux différents.



Résumé du Chapitre 12

- Les processus impliqués dans le développement du système nerveux sont globalement similaires à ceux trouvés pour le développement des autres systèmes, mais requièrent l'acquisition d'identités cellulaires telles qu'un nombre important de connexions cellules-cellules très spécialisées soient générées parfois sur de longues distances.
- Le neuroectoderme précoce est tout d'abord configuré en grandes régions, aux devenirs distincts et variés, sous l'action de centres de signalisation locaux, avant que n'apparaissent des types neuronaux spécifiques à chaque région.
- Des molécules de signalisation confèrent une information de position dans une zone sensible en générant un gradient de diffusion qui induit l'expression de facteurs de transcription agissant comme déterminants pour une région ou un type cellulaire donné.

- Le tissu neural présomptif est spécifié très tôt au cours du développement, pendant la gastrulation chez les vertébrés, et quand l'axe dorso-ventral est organisé chez la drosophile.
- Dans le neuroectoderme, la spécification des cellules donnant lieu aux cellules neurales implique une inhibition latérale.
- Le développement ultérieur des neurones à partir des précurseurs neuronaux repose à la fois sur des divisions cellulaires asymétriques et une signalisation cellule-cellule.
- La mise en place du patron des différents types de neurones dans la moelle épinière des vertébrés résulte de signaux dorsaux et ventraux.
- Au cours du développement, les neurones émettent des axones et des dendrites. Les axones sont guidés dans leur navigation par les cônes de croissance situés à leurs extrémités.
- Le guidage axonal résulte de la réponse du cône de croissance à des signaux attractifs ou répulsifs, qui peuvent être soit diffusibles soit liés au substrat.
- Des gradients de ces molécules peuvent guider les axones vers leur destination, comme c'est le cas dans le système rétino-tectal des vertébrés.
- Le fonctionnement du système nerveux dépend de l'établissement de synapses spécifiques entre les axones et leurs cibles.
- La spécificité semble être atteinte par une surproduction initiale de neurones qui entrent en compétition pour des cibles, avec une mort de nombreux neurones au cours du développement. Le raffinement des connexions synaptiques implique une compétition subséquente.
- L'activité neuronale joue un rôle majeur dans le raffinement des connexions, comme celles entre l'œil et le cerveau.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Comment l'information de position et la valeur de position sont-elles affectées au cours de la régionalisation du neuroecto-derme chez les vertébrés ?

2. La réponse du mésencéphale postérieur à la signalisation de FGF-8 à partir de l'isthme, est différente de celle du rhombencépale antérieur. Comment cette asymétrie peut-elle être contrôlée ?

3. Quelles sont les caractéristiques distinctives des centres de signalisation locaux ou organisateurs ? En quoi diffèrent-ils de l'organisateur primaire de Spemann ?

4. Définir les rhombomères. Quels sont les points communs entre la segmentation rhombomérique et la segmentation de la larve de drosophile ?

5. Décrire une expérience qui démontre la transformation homéotique des rhombomères. Exposer les grandes lignes de la stratégie utilisée pour conduire aux transformations homéotiques en prenant des exemples aussi bien chez les vertébrés que les non-vertébrés.

6. La formation des motoneurones dans la moelle épinière en développement dépend d'un gradient de la protéine Sonic hedgehog (Shh). Quelle est la source de ce gradient ? Quels sont les gènes des protéines à homéodomaine de classe I et II qui sont actifs en réponse au niveau précis de ce gradient requis pour que les progéniteurs de motoneurones se spécifient en motoneurones ? Quel est le rôle exercé par les protéines à homéodomaine LIM dans l'identité des motoneurones ?

7. Chez la drosophile, le système nerveux central est ventral, alors que chez les vertébrés il est dorsal. Malgré cette différence, quels sont les points communs existants qui pourraient indiquer une origine évolutive commune ?

8. Indiquer les grandes lignes des mécanismes de l'inhibition latérale dans les amas proneuraux de la drosophile, au cours desquels la production de Delta dans une cellule conduit à la perte de Delta dans une cellule adjacente. Comparer la voie chez la drosophile avec celle présente chez les vertébrés.

9. Comment les protéines Numb et Pins collaborent-elles pour faire qu'une cellule fille devienne un neurone après la division (a) du neuroblaste chez l'embryon de drosophile, (b) du précurseur de l'organe sensoriel chez la drosophile adulte ?

10. Définir les cellules de la glie radiaire. La réponse inclura : la structure embryonnaire dans laquelle elles se trouvent, leur loca-lisation dans cette structure et leurs rôles au cours du développement du système nerveux (nommer deux rôles).

11. Quel est l'avantage évolutif du patron différent de neurogenèse et des migrations neuronales qui distinguent le cortex des mammifères de la moelle épinière, par exemple.

12. Bien qu'en général de nouveaux neurones ne soient pas générés dans le cerveau adulte des mammifères, le gyrus denté de l'hippocampe est une exception. Rapporter cette observation à l'origine embryologique des neurones dans le tube neural.

13. Faire ressortir les similitudes et les différences entre les nétrines, sémaphorines, cadhérines et éphrines, en précisant en quoi les effets des cadhérines et des nétrines sont similaires et en quoi ils diffèrent, en quoi ceux des sémaphorines et des éphrines sont similaires, et en quoi ils diffèrent.

14. Que signifie la proposition : « la rétine est cartographiée sur le tectum » (voir Fig. 12.31) ? Comment l'hypothèse de la chimioaffinité essaie-t-elle d'expliquer ce phénomène ? Comment les éphrines et leurs récepteurs se conforment-ils à cette hypothèse ?

15. Décrire les conséquences de l'expérience consistant à sectionner le nerf optique d'une grenouille et à retourner l'œil de 180° ? Comment explique-t-on la réponse de la grenouille qui s'ensuit à un stimulus visuel ?

16. Quel est le rôle des facteurs neurotrophiques, tel que le facteur de croissance nerveuse, dans le raffinement des connexions entre les neurones et leurs cibles ? Donner un exemple spécifique de cette action.

17. Faire le schéma d'une synapse, en identifiant la cellule pré-synaptique et la cellule post-synaptique, et en indiquant le sens de transmission de l'influx nerveux. Indiquer la fente synaptique et préciser en quoi elle empêche les neurones de transmettre des signaux électriques directement de l'un à l'autre. Comment les neurones communiquent-ils à travers la fente synaptique ?

18. Décrire les étapes apparaissant dans la formation de la jonction neuromusculaire, en commençant avec la signalisation induite par l'Agrine sur le cône de croissance axonal.

19. La mort cellulaire (apoptose) au cours du développement du système nerveux est sous le contrôle à la fois de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Donner des exemples de protéines intrinsèques (c'est-à-dire intracellulaires) et extrinsèques (c'est-à-dire de signalisation cellule-cellule), qui contrôlent l'apoptose dans le système nerveux en développement.

20. Opposer l'influx rétinien destiné au corps genouillé latéral et au tectum, respectivement dans les encéphales de mammifère et d'amphibien. Qu'entend-t-on par colonnes de dominance oculaire, et pourquoi sont-elles importantes ? Que signifie « un lien se crée entre les cellules qui déchargent en même temps » ?

QCM

- **NB.** Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.
- 1. Les organisateurs locaux du patron cérébral
- a) ont une origine mésodermique
- b) cessent d'intervenir après la fermeture de la plaque neurale
- c) peuvent fonctionner selon deux directions
- d) ont des taux de prolifération cellulaire élevés
- **2.** À quels dérivés les cellules des crêtes neurales contribuent-elles ? a) les mélanocytes cutanés
- b) les composants mésenchymateux de la face et de l'os
- c) le système nerveux périphérique
- d) tous les dérivés cités ci-dessus
- **3.** Dans le cortex cérébral en développement
- a) les neurones excitateurs et inhibiteurs proviennent tous de la zone ventriculaire du cortex
- b) les neurones excitateurs ont des connexions locales alors que les neurones inhibiteurs établissent des connexions à longue distance
- c) la couche de neurones la plus externe est générée après la couche VI.
- d) l'identité des aires est définie par les axones afférents du thalamus
- **4.** Quel est le type de protéines codées par les gènes du complexe *achaete-scute* ?
- a) des molécules d'adhérence cellulaire
- b) des protéines du cytosquelette
- c) des protéines de transport membranaire
- d) des facteurs de transcription

- **5.** Le système nerveux central des vertébrés (cerveau et moelle épinière) dérive
- a) des cellules du tube neural
- b) des cellules des crêtes neurales qui migrent le long de la voie dorso-latérale
- c) des cellules des crêtes neurales qui migrent à travers la moitié antérieure des somites
- d) du mésoderme somitique

6. Quelle serait la conséquence de la réduction de la production de Delta dans le tube neural en développement des vertébrés ?

- a) Une production excessive de neurones, car la réduction de Delta empêche l'inhibition de la neurogenèse pour les cellules voisines.
- b) Une production excessive de neurones, car la réduction de la production de Delta augmente la production de neurogénine.
- c) Une production diminuée de neurones, car la signalisation Delta est requise pour la neurogenèse.
- d) Il n'y a aucun changement dans la neurogenèse, à moins que Delta ne soit complètement éliminé.

7. Laquelle des propositions suivantes est un type neuronal déterminé ?

- a) des cellules des crêtes neurales pré-migatoires
- b) des cellules de la plaque du plancher
- c) des cellules commissurales
- d) des cellules de la plaque du toit

8. Les neurones corticaux migrent vers leurs positions définitives dans le cortex le long

- a) des cellules de Schwann
- b) des neurones commissuraux
- c) de la glie radiaire
- d) des cellules de la plaque du toit

9. Les axones des neurones de la colonne motrice latérale chez l'embryon de poulet innervent

- a) les muscles de la paroi du corps
- b) les muscles des bourgeons des membres
- c) les muscles rattachés à la colonne vertébrale
- d) des muscles de la paroi intestinale

10. Laquelle de ces molécules est une molécule d'adhérence cellulaire qui attire avant tout les axones lors de leur croissance ?

- a) les neurotrophines
- b) les cadhérines
- c) les nétrines
- d) les sémaphorines

11. Des *knock-outs* du gène *netrin-1* chez la souris produisent un phénotype similaire à quels *knock-outs* de gènes ou produits suivants ?

- a) le récepteur DCC
- b) le récepteur Robo1
- c) la molécule de signalisation sémaphorine
- d) la molécule de signalisation Slit

12. Les neurones de la région nasale de la rétine droite projetteront leurs axones vers

- a) la portion antérieure du tectum gauche
- b) la portion antérieure du tectum droit
- c) la portion postérieure du tectum gauche
- d) la portion postérieure du tectum droit

13. Les synapses établies entre les motoneurones et les muscles sont nommées

a) myotomes

b) jonctions neuromusculaires

- c) centres de Nieuwkoop
- d) projections rétino-tectales

14. Les cellules de Schwann

- a) sont des cellules gliales
- b) sont responsables de la myélinisation des axones dans le système nerveux périphérique
- c) ont un rapport avec les oligodendrocytes du système nerveux central
- d) correspondent à toutes les propositions ci-dessus

15. Le neurotransmetteur utilisé dans la communication entre les motoneurones et les muscles est

- a) la sérotonine
- b) la dopamine
- c) la noradrénaline
- d) l'acétylcholine

Réponses aux QCM

1 : c, 2 : d, 3 : a, 4 : d, 5 : a, 6 : a, 7 : c, 8 : c, 9 : b, 10 : b, 11 : a, 12 : c, 13 : b, 14 : d, 15 : d.

Références bibliographiques générales

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.H., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J. : *Principles of Neural Science* (5th edn). New York : McGraw-Hill, 2013.

Kerszberg, M. : Genes, neurons and codes : remarks on biological communication. *BioEssays* 2003, 25 : 699–708.

Squire, L.R., Berg, D., Bloom, F.E., Du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N.C. : *Fundamental Neuroscience* (4th edn). New York : Academic Press, 2013.

Références bibliographiques spécifiques

12.1 La régionalisation initiale du cerveau des vertébrés implique des signaux d'organisateurs locaux

Kiecker, C., Lumsden, A. : The role of organizers in patterning the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2012, **35**: 347–367.

12.2 Les centres de signalisation locaux façonnent le cerveau le long de l'axe antéro-postérieur

- Broccoli, V., Boncinelli, E., Wurst, W. : **The caudal limit of** *Otx2* **expression positions the isthmc organizer**. *Nature*, 1999, **401** : 164–168.
- Crossley, P.H., Martinez, S., Martin, G.R. : Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*, 1996, 380 : 66–68.
- Houart, C., Westerfield, M., Wilson, S.W. : A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature*, 1998, 391 : 788–792.

Millet, S. : A role for *Gbx2* in repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature*, 1999, 401 : 161–164.

Rhinn, M., Brand, M. : The midbrain-hindbrain boundary organizer. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001, 11: 34–42.

Zeltser, L.M., Larsen, C.W., Lumsden, A. : A new developmental compartment in the forebrain regulated by *Lunatic fringe*. *Nat. Neurosci.* 2001, **4** : 683–684.

12.3 Le cortex cérébral est façonné par des signaux de la crête neurale antérieure

Hamasaki, T., Leingaertner, A., Ringstedt, T., O'Leary, D.D.M. : Emx2 regulates sizes and positioning of the primary sensory and motor areas in neocortex by direct specification of cortical progenitors. *Neuron* 2004, **43** : 359–372.

Hanashima, C., Li, S.C., Shen, L., Lai, E., Fishell, G. : Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science* 2004, 303 : 56–59.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J., Macklis, J.D. : **Neuronal subtype specification in the cerebral cortex**. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007, **8 :** 427–437.

O'Leary, D.D.M., Nakagawa, Y. : Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002, **12**: 14–25.

Rakic, P. : Evolution of the necortex : a perspective from developmental biology. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009, **10** : 724–735.

Shimamura, K., Rubenstein, J.L.R. : Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development*, 1997, **124** : 2709–2718.

Toyoda, R., Assimacopoulos, S., Wilcoxon, J., Tayloy, A., Feldman, P., Suzuki-Hirano, A., Shimogori, T., Grove, E.A. : **FGF8 acts as a classic diffusible morphogen to pattern the neocortex.** *Development* 2010, **137** : 3439–3448.

12.4 Le rhombencéphale est segmenté en rhombomères par des limites de restriction de lignage cellulaire

Fraser, S., Keynes, R.J., Lumsden, A. : **Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions**. *Nature* 1990, **344 :** 636–638.

Lumsden, A., Keynes, R.J. : **Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain**. *Nature* 1989, **337** : 424–428.

Wizenmann, A., Lumsden, A. : Segregation of rhombomeres by differential cell affinity. Mol. Cell Neurosci. 1997, 9: 448–459.

Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V., Wilkinson, D.W. : *In vivo* cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrin ligands. *Nature* 1999, **399** : 267–271.

12.5 Les gènes Hox fournissent une information de position dans le rhombencéphale en développement

Bell, E., Wingate, R., Lumsden, A. : Homeotic transformation of rhombomere identity after localized Hoxb1 misexpression. *Science* 1999, 284 : 2168–2171.

Gavalas, A., Krumlauf, R. : **Retinoid signalling and hindbrain patterning**. *Curr. Opin. Genet Dev.* 2000, **10 :** 380–386.

Grammatopoulos, G.A., Bell, E., Toole, L., Lumsden, A., Tucker, A.S. Homeotic transformation of branchial arch identity after Hoxa2 overexpression. *Development* 2000, **127** : 5355–5365.

Krumlauf, R. : Hox genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. *Trends Genet.* 1993, **9**: 106–112.

Rijli, F.M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dolle, P., Chambon, P. : A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of Hoxa2, which acts as a selector gene. *Cell* 1993, **75** : 1333–1349. Wassef, M.A., Chomette, D., Pouilhe, M., Stedman, A., Havis, E., Trin-Dihn-Desmarquet, C., Schneider-Maunoury, S., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P., Ghislain, J. : Rostral hindbrain patterning involves the direct activation of a Krox20 transcriptional enhancer by Hox/Pbx and Meis activators. Development 2008, 135 : 3369–3378.

12.6 Le patron de différenciation cellulaire le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière dépend de signaux ventraux et dosaux

- Le Douarin, N., Creuzet, S., Couly, G., Dupin, E. : Neural crest plasticity and its limits. *Development* 2004, 131 : 4637–4650.
- Keynes, R., Lumsden, A. : Segmentation and the origin of regional diversity in the vertebrate central nervous system. *Neuron* 1990, 4: 1–9.

12.7 Les sous-types neuronaux de la moelle épinière ventrale sont spécifiés par le gradient ventro-dorsal de Shh

Briscoe, J., Pierani A., Jessell, T.M., Ericson, J. : A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 2000, **101** : 435–445.

- Jessell, T.M. : Neuronal specification in the spinal cord : inductive signals and transcriptional controls. *Nat. Rev. Genet.* 2000, 1: 20–29.
- Megason, S.G., McMahon, A.P. : A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. Development 2002, 129 : 2087–2098.

12.8 Des motoneurones spinaux avec des positions dorsoventrales distinctes innervent des muscles différents du tronc et des membres

- Chamberlain, C.E.Jeong, J., Guo, C., Allen, B.L., McMahon, A.P. : Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. Development 2008, **135** : 1097–1106.
- Dessaud, E., McMahon, A.P., Briscoe, J. : Pattern formation in the vertebrate neural tube : a sonic hedgehog morphogenregulated transcriptional network. *Development* 2008, 135 : 2489–2503.
- Dessaud, E., Yang, L.L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitch, B.G., Briscoe, J. : Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 2007, 450 : 717–720.
- Stamataki, D., Ulloa, F., Tsoni, S.V., Mynett, A., Briscoe, J. : A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev.* 2005, 19 : 626-641.

12.9 Des signaux sécrétés à partir du nœud de Hensen et du mésoderme adjacent déterminent le patron antéro-postérieur de la moelle épinière

Dasen, J.S., Jessell, T.M. : Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2009, **88**: 169–200.

Ensini M., Tsuchida T.N., Belting, H.G., Jessell, T.M. : **The** control of rostrocaudal pattern in the developing spinal cord : specification of motor neuron subtype identity is initiated by signals from paraxial mesoderm. *Development* 1998, **125** : 969–982.

Sockanathan, S., Perlmann, T., Jessell, T.M. : Retinoid receptor signaling in postmitotic motor neurons regulates rostrocaudal

positional identity and axonal projection pattern. *Neuron* 2003, **40**: 97–111.

12.10 Chez la drosophile les neurones sont formés à partir des amas proneuraux

Cornell, R.A., Ohlen, T.V. : Vnd/nkx, ind/gsh, and msh/msx : conserved regulators of dorso-ventral neural patterning ? *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000, **10** : 63–71.

Skeath, J.B. : At the nexus between pattern formation and celltype specification : the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *BioEssays* 1999, **21** : 922–931.

Weiss, J.B., Von Ohlen, T., Mellerick, D.M., Dressler, G., Doe, C.Q., Scott, M.P. : Dorso-ventral patterning in the *Drosophila* central nervous system : the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev.* 1998, 12 : 3591–3602.

12.11 Le développement des neurones chez la drosophile implique des divisions cellulaires asymétriques et des changements dans le temps de l'expression des gènes

Brody, T., Odenwald, W. : **Regulation of temporal identities during** *Drosophila* **neuroblast lineage development**. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005, **17 :** 672–675.

Grosskortenhaus, R., Pearson, B.J., Marusich, A., Doe, C.Q.:
Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Dev. Cell* 2005, 8: 193–202.

Jan, Y-N., Jan, L.Y. : Polarity in cell division : what frames thy fearful asymmetry ? *Cell* 2000, **100** : 599–602.

Karcavich, R.E. : Generating neuronal diversity in the *Drosophila* central nervous system : a view from the ganglion mother cells. *Dev. Dyn.* 2005, 232 : 609–616.

ENCART 12A Spécification des organes sensoriels de la Drosophile adulte

Gómez-Skarmeta, J.L., Campuzano, S., Modolell, J. : Half a century of neural prepatterning : the story of a few bristles and many genes. Nat. Rev. Neurosci. 2003, 4 : 587–598.

Knoblich, J.A. : Asymmetric cell division during animal development. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2001, 2: 11–20.

12.12 La production des neurones chez les vertébrés implique, comme pour la drosophile, une inhibition latérale

Chitins, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowitcz, D., Kintner, C. : Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta*. *Nature* 1995, **375** : 761–766.

Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D.J. : Identification of *neurogenin*, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 1996, 87 : 43–52.

12.13 Les neurones sont formés dans la zone proliférative du tube neural des vertébrés et migrent vers l'extérieur

D'Arcangelo, G., Curran, T. : *Reeler :* new tales on an old mutant mouse. *BioEssays* 1998, **20**: 235–244.

- Gage, F.H. : Mammalian neural stem cells. *Science* 2000, **287** : 1433–1438.
- Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R.L., Kriegstein, A.R. : Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 2010, 464 : 554–561.

Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A. : The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu. Rev. Neurosci. 2009, 32 : 149–184.

Kriegstein, A.R., Noctor, S., Martinez-Cerdano, V. : Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006, 7 : 883–890.

Lancaster, M.A., Knoblich, J.A. : **Spindle orientation in** mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2012, **22** : 737–746.

Lyuksyutova, A.I., Lu, C.C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M., Zou, Y. : Anteriorposterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 2003, **302** : 1984–1988.

ENCART 12B Chronologie de la naissance des neurones corticaux

Rakic, P. : Neurons in rhesus monkey visual cortex : systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 1974, **183 :** 425–427.

12.14 De nombreux interneurones corticaux migrent tangentiellement

Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., Rubenstein, J.L.R. :
 Interneuron migration from basal forebrain to neocortex :
 dependence on *Dlx* genes. *Science* 1997, 278 : 474–476.

Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M.Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L.R., Marin, O. : Shortand long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by Neuregulin-1. Neuron 2004, 44 : 251–261.

De Marco Garcia, N.V., Karayannis, T., Fishell, G. : Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* 2011, **472** : 351–355.

Marin, O., Rubenstein, J.L.R. : A long, remarkable journey : tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001, **2** : 780–790.

Wonders, C.P., Anderson, S.A. : The origin and specification of cortical interneurons. Nat. Rev. Neurosci. 2006, 7: 687–696.

12.15 Le cône de croissance contrôle le trajet suivi par l'axone en croissance

Baudet, M.L., Bellon, A., Holt, C.E. : Role of microRNAs in Semaphorin function and neural circuit formation. Semin. Cell Dev. Biol. 2013, 24 : 146–155.

Drees, F., Gertler, F.B. : Ena/VASP : proteins at the tip of the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2008, 18: 53–59.

Dudanova, I., Klein, R. : Integration of guidance cues : parallel signaling and crosstalk. *Trends Neurosci.* 2013, **36** : 295–304.

Lowery, L.A., Van Vactor, D. : The trip of the tip : understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2009, 10 : 332–343.

Tear, G. : Neuronal guidance : a genetic perspective. *Trends Genet*. 1999, **15** : 113–118.

ENCART 12C Développement du circuit neuronal dans le réflexe rotulien

Arber, S. : Motor circuits in action : specification, connectivity, and function. *Neuron* 2012, **74** : 975–989.

Brierley, D.J., Rathore, K., Vijayraghavan, K., Williams, D. : Dendritic targeting in the leg neuropil of *Drosophila* : the

role of midline signalling molecules in generating a myotopic map. *PLoS Biol* 2009, **7** : e100019.

 Li, W-C., Cooke, T., Sautois, B., Soffe, S.R., Borisyuk, R., Roberts,
 A. : Axon and dendrite geography predict the specificity of synaptic connections in a functioning spinal cord network. *Neural Dev.* 2007, 2: 17.

Surmeli, G., Akay, T., Ippolito, G.C., Tucker, P.W., Jessell, T.M. : Patterns of spinal sensory-motor connectivity prescribed by a dorso-ventral positional template. *Cell* 2011, **147** : 653–665.

12.16 Les axones des motoneurones du membre de poulet sont guidés par des interactions éphrines-Eph

Lance-Jones, C., Landmesser, L. : **Pathway selection by embryonic chick motoneurons in an experimentally altered environment**. *Proc. R. Soc. Lond. B* 1981, **214 :** 19–52.

Tosney, K.W, Hotary, K.B., Lance-Jones, C. : **Specifying the target** identity of motoneurons. *BioEssays* 1995, **17** : 379–382.

Xu, N-J., Henkemeyer, M. : Ephrin reverse signaling in axon guidance and synaptogenesis. Semin. Cell Dev. Biol. 2012, 23: 58–64.

12.17 Les axones franchissant la ligne médiane sont à la fois attirés et repoussés

Chédotal, A. : Further tales of the midline. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011, **21 :** 68–75.

Giger, R.J., Kolodkin, A.L. : Silencing the siren : guidance cue hierarchies at the CNS midline. *Cell* 2001, 105 : 1–4.

Simpson, J.H., Bland, K.S., Fetter, R.D., Goodman, C.S. : Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors : a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 2000, **103** : 1019–1032.

Williams, S.E., Mason, C.A., Herrera, E. : The optic chiasm as a midline choice point. Curr. Opin. Neurobiol. 2004, 14: 51–60.

Zou, Y., Lyuksyutova, A.I. : Morphogens as conserved axon guidance cues. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007, 17: 22–28.

12.18 Les neurones de la rétine établissent des connexions ordonnées avec les centres visuels du cerveau

Hansen, M.J., Dallal, G.E., Flanagan, J.G. : **Retinoic axon response to ephrin-As shows a graded concentrationdependent transition from growth promotion to inhibition**. *Neuron* 2004, **42** : 707–730.

Klein, R. : Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004, 16 : 580–589.

Löschinger, J., Weth, F., Bonhoeffer, F. : **Reading of concentration** gradients by axonal growth cones. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 2000, **355** : 971–982.

McLaughlin, T., Hindges, R., O'Leary, D.D. : **Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain**. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003, **13**: 57–69.

Petros, T.J., Shrestha, B.R., Mason, C. : **Specificity and sufficiency** of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. *J. Neurosci.* 2009, **29** : 3463–3474.

Reber, M., Bursold, P., Lemke, G. : A relative signalling model for the formation of a topographic neural map. *Nature* 2004, **431** : 847–853.

Suetterlin, P., Marler, K.M., Drescher, U. : Axonal ephrinA/EphA interactions, and the emergence of order in topographic projections. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2012, 23: 1–6.

12.19 La formation des synapses repose sur des interactions réciproques

- Buffelli, M., Burgess, R.W., Feng, G., Lobe, C.G., Lichtman, J.W., Sanes, J.R. : Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature* 2003, **424** : 430–434.
- Clarke, L.E., Barres, B.A. : **Emerging roles of astrocytes in neural** circuit development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013, **14** : 311–321.
- Goda, Y., Davis, G.W. : Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 2003, **40** : 243–264.
- Hua, J.Y, Smith, S.J. : Neural activity and the dynamics of central nervous-system development. Nat. Neurosci. 2004, 7 : 327–332.
- Jan, Y-N., Jan, L.Y. : **The control of dendritic development**. *Neuron* 2003, **40** : 229–242.
- Jin, Y., Garner, C.C. : Molecular mechanisms of presynaptic differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2008, **24** : 237–262.
- Katz, L.C., Constantine-Paton, M. : Relationships between segregated afferents and postsynaptic neurones in the optic tectum of three-eyed frogs. J. Neurosci. 1988, 8 : 3160–3180.

Kummer, T.T., Misgled, T., Sanes, J.R. : Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006, 16 : 74–82.

- Levinson, J.N., El-Husseini, A. : **Building excitatory and inhibitory synapses : balancing neuroligin partnerships**. *Neuron* 2005, **48 :** 171–174.
- Li, Z., Sheng, M. : Some assembly required : the development of neuronal synapses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4 : 833–841.
- Pasterkamp, R.J. : Getting neural circuits into shape with semaphorins. Nat. Rev. Neurosci. 2012, 13: 605–618.
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., Zipursky, S.L. : *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 2000, 101 : 671–684.

ENCART 12D L'autisme : une anomalie du développement impliquant un dysfonctionnement synaptique

- Ebert, D.H., Greenberg, M.E. : Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature* 2013, **493** : 327–337.
- Geschwind, D.H. : Autism : many genes, common pathways ? *Cell* 2008, **135** : 391–395.
- Grabrucker, A.M. : Environmental factors in autism. *Front. Psychiatry* 2012, **3** : 118.

Guy, J.G., Gan, J., Selfridge, J., Cobb, S., Bird, A. : Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 2007, 315 : 1143–1147.

Sidorov, M.S., Auerbach, B.D., Bear, M.F. : Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. *Mol. Brain* 2013, 6: 15.

- Sudhof, T. : Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 2008, **455** : 903–911.
- Walsh, C.A., Morrow, E.M., Rubenstein, J.L.R. : Autism and brain development. *Cell* 2008, **135** : 396–400.

12.20 Beaucoup de motoneurones meurent au cours du développement normal

Oppenheim, R.W. : Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 1991, 14 : 453–501.

Pettmann, B., Henderson, C.E. : Neuronal cell death. Neuron 1998, 20 : 633–647.

12.21 La mort et la survie des neurones impliquent à la fois des facteurs intrinsèques et extrinsèques

Burden, S.J. : White as retrograde signals for axon and growth cone differentiation. *Cell* 2000, **100** : 495–497.

Davies, A.M. : **Neurotrophic factors. Switching neurotrophin dependence**. *Curr. Biol.* 1994, **4** : 273–276.

Harrington, A.W., Ginty, D.D. : Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013, 14 : 177–187.

Jiang, Y., de Bruin, A., Caldas, H., Fangusaro, J., Hayes, J., Conway, E.M., Robinson, M.L., Altura, R.A. : Essential role for survivin in early brain development. J. Neurosci. 2005, 25 : 6962–6970.

Park, H., Poo, M.M. : Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. Nat. Rev. Neurosci. 2013, 14: 7–23.

12.22 Les projections rétinotopiques du cerveau sont affinées par l'activité neuronale

- Del Rio, T., Feller, M.B. : **Early retinal activity and visual circuit development**. *Neuron* 2006, **52** : 221–222.
- Huberman, A.D. : Mechanisms of eye-specific visual circuit development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007, **7**: 73–80.
- Katz, L.C., Crowley, J.C. : Development of cortical circuits : lessons from ocular dominance columns. Nat. Rev. Neurosci. 2002, 3: 34–42.
- Katz, L.C., Shatz, C.J. : Synaptic activity and the construction of cortical circuits. Science 1996, 274 : 1133–1138.

Serafini, T. : Finding a partner in a crowd : neuronal diversity and synaptogenesis. *Cell* 1999, **98** : 133–136.

13

Croissance, développement post-embryonnaire et régénération

Régénération

Croissance

• Mue et métamorphose

Le contrôle de la croissance, et donc de la taille, est un aspect majeur du développement des organismes. Ce contrôle est intimement lié à celui de la prolifération cellulaire qui est crucial pendant la vie adulte car une prolifération incontrôlée peut donner naissance à des cancers. Les programmes génétiques qui déterminent pourquoi différentes espèces atteignent des tailles caractéristiques différentes, restent néanmoins un mystère complet. Dans ce chapitre, sera examinée la balance entre des programmes intrinsèques de prolifération cellulaire agissant pendant le développement embryonnaire et la croissance survenant généralement à des stades plus tardifs du développement et qui est stimulée par des signaux extrinsèques tels que les hormones circulantes. Un aspect important du développement post-embryonnaire chez de nombreux animaux est la métamorphose durant laquelle la forme de l'animal change profondément lors du passage de l'état larvaire à l'état adulte. Dans ce chapitre, certains aspects de la métamorphose seront abordés chez les insectes et les amphibiens. Certains animaux ont la capacité, à l'état adulte, de reformer certaines parties de leurs corps, comme la queue, les pattes ou même le cœur, après une blessure. L'origine des cellules impliquées dans la régénération et les mécanismes contrôlant la mise en place de l'organisation des structures régénérées et leur croissance seront étudiés en prenant des exemples chez les amphibiens, les insectes et le poisson-zèbre. Le stade final du développement post-embryonnaire chez la plupart des organismes est le vieillissement qui résulte de l'accumulation de dommages cellulaires qui finissent par surpasser la capacité du corps à se réparer lui-même. Le déclin avec l'âge de cette capacité est appelé la sénescence et est programmé génétiquement.

Le développement ne s'achève pas quand l'embryogenèse est terminée. La majeure partie de la croissance des animaux et des plantes se déroule pendant la période post-embryonnaire quand la structure de base de l'organisme est déjà établie. La croissance est un aspect fondamental du développement en définissant la forme et la taille de l'organisme et de ses différentes parties. Chez de nombreux animaux, le stade embryonnaire est immédiatement suivi d'un stade larvaire libre ou d'un stade juvénile pendant lequel a lieu la croissance. Chez d'autres, tels les mammifères, une croissance considérable se produit à la fin du développement embryonnaire ou fœtal alors que l'embryon dépend encore des apports maternels. La croissance continue

• Vieillissement et sénescence



Fig. 13.1 Les trois mécanismes principaux de la croissance chez les vertébrés. Le mécanisme le plus commun est la prolifération cellulaire, la croissance des cellules suivie de leur division. Un second mécanisme est l'augmentation de la taille des cellules non suivie de division. Le troisième mécanisme est la croissance par accrétion, par exemple *via* la sécrétion d'une matrice extracellulaire. ensuite après la naissance. Chez les animaux avec des stades larvaires, la larve ne va pas simplement croître mais va également subir une phase de **métamorphose** la transformant en adulte. La métamorphose comporte souvent des changements radicaux dans la forme de l'organisme, ainsi que la formation de nouveaux organes.

La régénération est la capacité qu'ont des organismes ayant terminé leur développement, à remplacer des tissus, des organes ou même parfois la majeure partie de leur corps, par la croissance ou la réorganisation de tissus somatiques. Tous les animaux peuvent réparer dans une certaine mesure leurs tissus endommagés, mais chez les vertébrés, la possibilité de régénérer des appendices amputés ou des organes lésés se retrouve de manière beaucoup plus restreinte. Dans ce chapitre, sera étudié un petit nombre d'exemples classiques de régénération, celle des pattes chez les amphibiens et les insectes, ainsi que celle du cœur chez le poisson-zèbre. Les capacités de régénération des mammifères sont beaucoup plus limitées. Ceux-ci, comme tous les vertébrés, peuvent renouveler certains de leurs tissus pendant toute leur vie à partir de cellules souches (Chapitre 8) et régénérer des parties de leur foie si celui-ci n'a pas été trop endommagé (Section 13.6). Ils ne peuvent, en revanche, pas régénérer leurs membres ou leur cœur. Pourquoi d'autres animaux proches d'un point de vue anatomique, comme les amphibiens et les poissons, le peuvent est une question très intrigante. Enfin, sera abordé également la dernière étape du développement post-embryonnaire, le vieillissement.

Contrairement aux animaux, chez lesquels les embryons sont des versions miniatures de la larve ou de l'adulte, les embryons de plante ressemblent peu aux plantes matures. La plupart des structures de celles-ci sont produites après la germination par les méristèmes caulinaires et racinaires, qui sont capables de croissance continue au cours de la vie de la plante. Certains aspects de la croissance chez les plantes sont discutés dans le Chapitre 7.

Au début de ce chapitre la notion même de croissance sera dans un premier temps discutée, puis seront abordées les questions relatives aux contrôles intrinsèques et extrinsèques de la croissance au cours du développement embryonnaire et post-embryonnaire, ainsi qu'aux perturbations de ces contrôles qui conduisent au développement de cancers.

Croissance

La croissance peut être définie comme l'augmentation de la masse ou de la taille totale d'un tissu ou d'un organisme, due à la prolifération cellulaire, l'augmentation de la taille des cellules sans divisions de celles-ci, ou l'accrétion de matériel extracellulaire comme de la matrice osseuse ou de l'eau (Fig. 13.1). Chez les animaux, la structure de base du corps est établie quand l'embryon est encore très petit en taille, de l'ordre de quelques millimètres. Le programme intrinsèque de croissance, c'est-àdire la taille que l'organisme et chacun de ses organes peuvent atteindre et la manière dont ils vont répondre à des stimulateurs de croissance comme les hormones, peut aussi être établi à des stades précoces du développement, comme cela sera vu dans le cas de la définition de la longueur des doigts chez les mammifères. L'essentiel de la croissance se passe néanmoins lors du développement post-embryonnaire, même s'il existe de nombreux cas où l'organogenèse elle-même nécessite de la croissance localisée. C'est le cas notamment dans le bourgeon de membre et dans le poumon chez les vertébrés (Chapitre 11). Des croissances différentielles sont également à la base des différences de taille du cerveau entre différentes espèces. Les progéniteurs neuronaux qui produisent le néocortex se divisent beaucoup plus avant de se différencier en neurones chez les primates que chez la souris par exemple, ce qui conduit à la formation d'un néocortex beaucoup plus étendu chez les premiers que chez la seconde. Plus généralement, des différences génétiquement programmées dans les taux de croissance de différentes parties du corps ou à différents moments du développement sont très importantes pour définir la forme de l'organisme et de ses organes.

Déterminées par la croissance, la taille des organes et la taille totale du corps de l'organisme sont bien sûr liées et vont être définies avec les mêmes principes. Une question fondamentale est de comprendre comment un organe individuel ou un organisme "sait" qu'il a atteint la taille correcte et doit donc arrêter de croître. Chez les mammifères, les très grandes différences de taille entre espèces sont principalement dues à des nombres très différents de cellules et pas à des différences dans la taille des cellules. Ainsi, un Homme de 70 kg possède environ 10^{13} cellules et a une masse corporelle environ 3 000 fois plus grande que celle d'une souris qui est composée d'environ 3×10^{9} cellules. En principe, la taille totale du corps pourrait donc être définie en contrôlant le nombre de divisions cellulaires et donc de cellules. Il existe néanmoins des cas où clairement ce sont les dimensions du corps qui sont contrôlées et pas le nombre absolu de cellules. Des salamandres naturellement tétraploïdes ont des cellules deux fois plus grandes que celles des salamandres diploïdes car ces cellules ont deux fois plus de chromosomes. Les deux types de salamandres ont néanmoins la même taille car les salamandres tétraploïdes ont moitié moins de cellules que leurs congénères diploïdes.

La croissance est contrôlée à la fois par des facteurs intrinsèques et extrinsèques. De nombreux progrès ont été faits dans l'identification et la compréhension du rôle des facteurs extrinsèques, tels les facteurs de croissance et les hormones, qui contrôlent la croissance. En revanche, la base génétique des différences de taille entre espèces reste complètement inconnue. Un exemple classique montrant l'existence d'un programme génétique intrinsèque de croissance provient d'expériences de greffes de bourgeons de membre entre des espèces de salamandres de tailles différentes appartenant au genre *Ambystoma*. Un bourgeon de membre d'une espèce de grande taille greffé chez un individu d'une espèce de petite taille, va d'abord croître lentement mais produira une patte de taille caractéristique de l'espèce donneuse, bien plus grande que celles de l'hôte (Fig. 13.2). Cette expérience montre que, quels que soient les facteurs circulants influençant la croissance, la réponse intrinsèque des tissus à ces facteurs est cruciale pour définir la taille qu'atteindront ces tissus.

13.1 Les tissus croissent par prolifération cellulaire, agrandissement des cellules, ou accrétion

La **prolifération cellulaire**, qui permet l'augmentation du nombre de cellules par divisions cellulaires mitotiques, est l'une des trois stratégies permettant la croissance des organes ou du corps (Fig. 13.1). Dans de nombreux tissus en développement, des événements de mort cellulaire programmée surviennent et le taux de croissance de ces tissus résultera donc d'une balance entre la prolifération et la mort cellulaire.

Une seconde stratégie est la **croissance par agrandissement des cellules**, c'està-dire l'augmentation de la taille et de la masse des cellules sans divisions cellulaires. C'est le cas lors de la croissance des tissus de la larve chez la drosophile, à l'exception des disques imaginaux où se manifeste une prolifération cellulaire. Chez les mammifères, les cellules musculaires squelettiques et cardiaques, ainsi que les neurones, se divisent peu (ou pas) après leur différenciation, mais continuent néanmoins à grandir. Les neurones le font par extension et croissance de leurs axones et dendrites. La croissance des cellules musculaires résulte de la fusion de fibres musculaires pré-existantes avec des cellules satellites, ce qui permet d'augmenter le nombre de noyaux présents dans ces fibres et par conséquent d'accroître également leur masse. En fait, la croissance dépend souvent d'une combinaison de prolifération cellulaire et d'agrandissement des cellules. Pour le cristallin par exemple, ses cellules, issues de divisions cellulaires se réalisant dans une zone de prolifération pendant une longue durée, ne croîtront considérablement en taille que lors de leur différenciation.

La troisième stratégie de croissance, la **croissance par accrétion**, consiste en une augmentation du volume de l'espace extracellulaire induite par une intense activité sécrétoire des cellules. Ce type de croissance est observé au niveau des cartilages et des os dont l'essentiel de la masse correspond à celle de la matrice extracellulaire.

Des voies de signalisation contrôlant l'agrandissement des cellules et la prolifération cellulaire ont été découvertes (Fig. 13.3). La voie TOR (pour *Target Of Rapamycin*) dont l'activité est régulée par les apports en nutriments, stimule l'accroissement de la taille des cellules. La voie Hippo contrôle le nombre de cellules en inhibant la prolifération cellulaire et en stimulant la mort cellulaire. Ces deux voies seront examinées plus avant dans le chapitre et la voie Hippo est discutée en détail dans l'Encart 13A.



Fig. 13.2 La taille des pattes est génétiquement programmée chez les salamandres. Un bourgeon de membre embryonnaire provenant d'une espèce de salamandre de grande taille, *Ambystoma tigrinum*, greffée chez un embryon d'une espèce de petite taille, *Ambystoma punctatum*, produira une patte ayant la taille caractéristique des pattes d'*Ambystoma tigrinum* et sera bien plus grande que celles d'*Ambystoma punctatum*.

Photographie reproduite avec l'autorisation de Harrison, R.G. : Organization and Development of the embryo. New Haven : Yale University Press, 1969.



Fig. 13.3 Détermination de la croissance des tissus par intégration de voies de signalisation contrôlant la taille des cellules et leur nombre. La protéine TOR (pour Target Of Rapamycin) est une sérinethréonine kinase qui contrôle la taille des organes en stimulant la croissance des cellules et donc l'augmentation de leur taille. La voie TOR intègre des informations d'une part, sur les ressources en énergie et en nutriments et, d'autre part, provenant de signaux dus à des facteurs de croissance. La protéine Hippo est également une sérinethréonine kinase qui agit dans une voie de signalisation (décrite dans l'Encart 13A) qui contrôle la taille des organes en limitant le nombre de cellules via l'inhibition de la prolifération cellulaire et la stimulation de l'apoptose.

Tumaneng, et al. : Organ size control by Hippo and TOR pathways. Curr. Biol. 2012, 22, R368-R370.



Fig. 13.4 La progression dans le cycle cellulaire est régulée par la concentration

des cyclines. Différentes cyclines (G₁/S, S et M) contrôlent le passage des cellules par les différentes phases du cycle. Leur concentration varie au cours du cycle cellulaire : lorsque la concentration des cyclines est élevée, elles se lient à leurs protéines kinases cycline-dépendantes correspondantes (non montrées ici) et rendent ces enzymes actives. Ces enzymes déclenchent les événements clés du cycle cellulaire comme l'initiation de la réplication en phase S ou l'entrée en mitose en phase M. Le cycle cellulaire est jalonné de points de contrôle (barres rouges) qui assurent que la cellule ne progresse pas vers la phase suivante du cycle sans avoir réalisé toutes les étapes de la phase précédente. À la fin de la mitose, les cyclines sont adressées au protéasome et détruites, ce qui fait que les cellules nouvellement formées se retrouvent en début de phase G, et peuvent donc démarrer un nouveau cycle.

D'après Morgan, D.O., The Cell Cycle. Oxford University Press, 2006.

13.2 La prolifération cellulaire est contrôlée par la régulation de l'entrée dans le cycle cellulaire

Quand une cellule eucaryote se divise par mitose, elle passe par une succession bien définie de phases qui constitue ce qu'on appelle le **cycle cellulaire** (Encart 1B). La cellule croît pendant les phases G_1 et G_2 , l'ADN est répliqué pendant la phase S et les chromosomes répliqués sont ségrégés dans les deux noyaux produits lors de la phase M. La cellule ensuite se divise (cytocinèse) pour donner deux cellules filles. Le cycle cellulaire représenté dans l'Encart 1B est le cycle "standard" d'une cellule somatique animale. En fonction du stade du développement et du type de cellules, la durée des phases du cycle peut fortement varier et certaines phases peuvent même être absentes dans certaines situations. Ainsi, au cours de l'étape de segmentation chez les amphibiens, les phases G_1 et G_2 sont virtuellement absentes.

La progression d'une phase à l'autre du cycle cellulaire est contrôlée par des variations dans la concentration de protéines appelées **cyclines** (Fig. 13.4). Ces protéines régulent le passage d'une phase à l'autre du cycle en activant des **protéines kinases cycline-dépendantes** (**Cdks**, pour *Cyclin-dependent kinases*) avec lesquelles elles forment des complexes. Ces kinases phosphorylent des protéines qui déclenchent les événements propres à chaque phase du cycle, telle la réplication de l'ADN lors de la phase S ou les événements requis pour la mitose lors de la phase M.

Une fois qu'une cellule est entrée dans le cycle cellulaire et a dépassé un point de contrôle particulier appelé point « Start » (situé dans la seconde partie de la phase G_1), elle pourra poursuivre et terminer le cycle sans avoir besoin d'aucun signal extérieur. Les transitions entre les différentes phases du cycle sont marquées par des points de contrôle du cycle cellulaire où la cellule vérifie que toutes les étapes précédentes ont été correctement et complètement réalisées. Si ce n'est pas le cas, le passage à la phase suivante sera retardé jusqu'à la réalisation complète des processus requis. Ainsi une cellule ne pourra passer en phase G_2 que si tout l'ADN a été répliqué. Le cycle cellulaire pourra même s'arrêter en cas de dommages importants et irréparables de l'ADN et dans ce cas la cellule entrera généralement en apoptose. Ces mécanismes de contrôle sont retrouvés dans toutes les cellules eucaryotes normales et servent notamment à empêcher les cellules de continuer à se diviser si leur ADN est endommagé.

Des signaux extracellulaires, par exemple des facteurs de croissance, contrôlent la prolifération cellulaire en stimulant l'entrée dans le cycle cellulaire. Des études menées sur des cellules animales en culture ont montré que des facteurs de croissance, pouvant être différents selon le type de cellules cultivées, sont essentiels pour que celles-ci puissent se multiplier. Quand une cellule somatique n'est pas stimulée à proliférer, elle se trouve généralement dans une phase de quiescence appelée G_0 dans laquelle elle est entrée juste après la mitose (Encart 1B). Les facteurs de croissance stimulent les cellules à sortir de G_0 et à poursuivre ainsi le cycle cellulaire. Chez un organisme adulte, la plupart des cellules sont quiescentes et nécessitent des signaux extérieurs pour rentrer dans le cycle cellulaire. De nombreuses molécules de signa-lisation décrites dans les chapitres précédents, comme les protéines FGF et celles de la famille TGF-β, ont été initialement découvertes grâce à leur capacité à stimuler la prolifération cellulaire et peuvent réguler ce processus tant pendant le développement que chez l'adulte. Certains facteurs de croissance sont spécifiques de tissus ou de types cellulaires particuliers, comme l'érythropoïétine qui stimule la prolifération des précurseurs des globules rouges (Section 8.8).

Il faut enfin noter que les cellules doivent recevoir des signaux extérieurs non seulement pour se diviser, mais aussi simplement pour survivre. En l'absence de toute stimulation extérieure, une cellule peut mourir par mort cellulaire programmée (apoptose ; Encart 6A).

13.3 Les divisions cellulaires au cours du développement précoce peuvent être contrôlées par un programme de développement intrinsèque

Chez de nombreux organismes, les divisions cellulaires au cours des toutes premières étapes du développement sont contrôlées par des facteurs internes à la cellule et ne nécessitent pas de stimulation extérieure par des facteurs de croissance. Un exemple bien documenté est l'embryon de drosophile chez lequel les premières divisions cellulaires sont contrôlées par des protéines qui interviennent également dans la mise en place de l'organisation de l'embryon et qui interagissent avec des composants du système de contrôle du cycle cellulaire.

Les premières divisions de l'embryon de drosophile sont rapides et synchronisées. Elles présentent la particularité de n'être que nucléaires, ce qui conduit à la formation d'un embryon syncytial (stade blastoderme syncytial ; Fig. 2.2). Les 13 premiers cycles cellulaires sont caractérisés par l'absence de phases G et ne sont donc constitués que de phases S et M alternées. Au cycle 14 survient un changement important dans le cycle cellulaire, similaire à celui observé chez les amphibiens au moment de la transition blastuléenne (Section 4.8). Le cycle 14 comporte en effet une phase G_2 bien définie et le caractère syncytial de l'embryon est perdu (stade blastoderme cellulaire). Une phase G_1 est observée à partir du cycle 16. Après les cycles 17 ou 18, les cellules de l'épiderme et du mésoderme cessent de se diviser. L'arrêt de la prolifération cellulaire est dû à l'épuisement des réserves de cycline E maternelle présentes à l'origine dans le zygote.

Au 14^e cycle, l'embryon de drosophile est subdivisé en une série de domaines mitotiques distincts au sein desquels les cellules se divisent de manière synchrone, mais à des moments différents d'un domaine à un autre (Fig. 13.5). Cette organisation est due à un changement dans la synthèse et la distribution d'une protéine appelée String. Il s'agit d'une phosphatase qui agit en déphosphorylant et activant une kinase cycline-dépendante, stimulant ainsi le passage de la phase G_2 vers la phase M. Les 13 premiers cycles de divisions sont contrôlés par des protéines String d'origine maternelle uniformément distribuées dans tout l'embryon. Les mitoses sont donc synchronisées partout dans l'embryon. Après le cycle 13, la protéine String maternelle disparaît, remplacée par des protéines String d'origine zygotique assurant à leur tour le contrôle de l'entrée en mitose des cellules.

La transcription du gène *string* se fait selon un profil spatio-temporel complexe et seules les cellules dans lesquelles ce gène est exprimé peuvent entrer en mitose. Une variabilité dans l'expression de *string* conduit donc à des rythmes de divisions différents dans les diverses régions de l'embryon, ce qui est important pour assurer la formation d'un nombre correct de cellules dans les différents tissus embryonnaires. Le profil d'expression de *string* est contrôlé par des facteurs de transcription codés notamment par les gènes gap, pair-rule et les gènes contrôlant la polarité dorsoventrale de l'embryon (Chapitre 2).

Le mésoderme présomptif constitue une exception à la règle selon laquelle l'expression de *string* conduit à la prolifération cellulaire. En effet, le mésoderme est



Fig. 13.5 Représentation des domaines mitotiques de l'embryon de drosophile. Les différentes régions composées de cellules se divisant de manière synchrone sont indiquées par différentes couleurs. Les nombres indiquent l'ordre dans lequel les cellules de ces domaines entament leur 14e cycle de mitose. Le schéma représente une vue latérale de l'embryon à un stade où le mésoderme a déjà été internalisé et où la formation des segments a débuté. Les segments sont indiqués par des marques noires. La partie antérieure de l'embryon est à gauche et la partie dorsale est en haut de la figure. La région grise dans la région dorsale est l'amnioséreuse. Le mésoderme internalisé et quelques autres domaines ne sont pas représentés sur ce schéma.

Illustration d'après Edgar, B.A., et al. : **Transcriptional regulation of string** (cdc25) : a link between developmental programming and the cell cycle. Development 1994, **120** : 3131-3143.



Fig. 13.6 Effets provoqués par des modifications de l'activité de la voie Hippo chez la drosophile et la souris. L'image du haut montre la taille excessive d'un disque d'aile de drosophile dans lequel Yki est surexprimé (à droite) par rapport à un disque normal (à gauche). Les deux photographies du milieu montrent la région thoracique d'une drosophile sauvage, à gauche, et d'une drosophile, à droite, présentant une hypertrophie due à la présence de clones de cellules homozygotes pour une mutation de perte de fonction du gène Hippo. Les images du bas montrent le foie d'une souris sauvage normale (à gauche) et d'une souris dont les gènes *Mst1* et *Mst2*, les deux homologues de Hippo chez les mammifères, ont été inactivés de manière conditionnelle pendant le développement embryonnaire (à droite). L'inactivation de ces deux gènes conduit à une très nette hypertrophie du foie.

En haut d'après Huang, J., et al. : The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila homolog of Yap. Cell 2005, 122 : 421-434.

Au milieu et en bas d'après Halder, G., Johnson, R.L. : **Hippo signaling : growth control and beyond**. Development 2011, **138** : 9-22. le premier domaine dans lequel *string* s'exprime, mais seulement le dixième où les cellules se divisent. Ce délai dans l'initiation de la mitose est dû à l'expression d'un autre gène, *tribbles*, dans ce domaine car la protéine Tribbles dégrade la protéine String, empêchant ainsi son activité. Ce délai permet la formation du sillon ventral et l'invagination du mésoderme (Section 9.9) qui ne peuvent pas se faire si les cellules se divisent. Les cellules mésodermiques commenceront à proliférer après avoir été internalisées. L'embryon de drosophile est donc un très bon exemple de contrôle génétique du patron des divisions cellulaires.

13.4 Des signaux extrinsèques coordonnent les divisions cellulaires, la croissance cellulaire et la mort cellulaire au cours du développement de l'aile de la drosophile

L'aile de drosophile constitue un excellent modèle pour étudier différents aspects de la croissance et plus particulièrement comment la taille d'un organe est déterminée. Contrairement à ce qui se passe chez l'embryon précoce soumis à une programmation intrinsèque, la croissance dans les disques imaginaux, y compris le disque d'aile, est modulée par des signaux extrinsèques et implique une coordination entre croissance, prolifération et mort des cellules.

Au moment de sa formation, le disque d'aile est composé d'environ 40 cellules et croîtra pendant la vie larvaire pour atteindre environ 50 000 cellules. Les divisions cellulaires se produisent partout dans le disque et cessent de manière uniforme quand le disque a atteint sa taille finale. Pendant la métamorphose, il y a très peu de divisions cellulaires dans le disque et celui-ci développe la structure de l'aile adulte principalement par des changements de forme des cellules (Fig. 11.27). Différentes expériences ont montré que la taille finale de l'aile ne dépend pas d'un nombre fixe de divisions cellulaires, mais dépend d'un mécanisme qui mesure la taille du disque d'aile en développement et ajuste en conséquence de manière coordonnée le nombre de divisions cellulaires et la taille des cellules. Il a également été montré que les descendants d'une cellule unique du disque peuvent contribuer à des pourcentages très différents de l'aile, allant d'un dixième jusqu'à près de la moitié de celle-ci.

La croissance de l'aile peut aussi être expérimentalement découplée de la prolifération cellulaire. Ainsi, si on bloque les divisions cellulaires dans le compartiment antérieur ou postérieur du disque d'aile de la larve, on obtient une aile de taille normale dans laquelle il y a bien sûr moins de cellules mais dont les cellules sont plus grandes. Dans le même ordre d'idées, la taille d'une région particulière de l'aile ne nécessite pas d'être déterminée par le taux de divisions cellulaires. Ceci peut être démontré en faisant des disques mosaïques comportant des cellules sauvages à croissance normale et des cellules *Minute* qui se divisent moins vite (Encart 2H). Un compartiment comportant les deux types de cellules aura plus de cellules sauvages que de cellules *Minute*, mais il présentera exactement la même taille que s'il n'était composé que de cellules sauvages.

Durant la croissance normale, la taille finale de l'aile (et des autres organes) est probablement définie grâce à une balance entre la prolifération et la mort cellulaire. Ces deux processus sont coordonnés par la voie de signalisation Hippo (Encart 13A), initialement découverte chez la drosophile, mais existant également chez les vertébrés. Cette voie chez la drosophile comporte une cascade de sérine-thréonine kinases, notamment Hippo, dont l'activité conduit à l'inactivation d'un co-activateur transcriptionnel appelé Yorkie (Yki).

Quand la voie est inactive, Yki est importé dans le noyau et forme un complexe avec des facteurs de transcription tissus-spécifiques. Ceci conduit à l'activation de l'expression de gènes codant des protéines stimulant la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose. Au contraire, quand la voie Hippo est active, la protéine Hippo phosphoryle une autre sérine-thréonine kinase, Warts, qui elle-même phosphoryle Yki. Sous sa forme phosphorylée, Yki n'est pas importé dans le noyau et ne peut donc pas activer la transcription. Des mutations de perte de fonction de *Hippo* ou de *Warts*, ou une surexpression de *Yki* dans le disque imaginal d'aile de la drosophile, conduisent à une très forte augmentation de la prolifération cellulaire et à une très forte diminution de l'apoptose. Ceci provoque une croissance exagérée du disque d'aile qui pourra atteindre presque huit fois la taille d'un disque sauvage (Fig. 13.6).

ENCART 13A Les éléments essentiels de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères

Le résultat de l'activation de la voie Hippo est l'inactivation du co-activateur transcriptionnel Yorkie (Yki) chez la drosophile (Figure 1 ; à gauche) ou de ses homologues Yap (pour Yes-Associated Protein) et Taz chez les mammifères (Figure 1 ; à droite). Quand la voie est inactive, Yki ou Yap/Taz sont importés dans le noyau et aident à activer la transcription de gènes codant des protéines stimulant la prolifération cellulaire ou inhibant l'apoptose. Quand la voie est active, des régulateurs comme Merlin (Mer), Expanded (Ex) et Kibra chez la drosophile (ou leurs homologues chez les mammifères, Neurofibromatosis 2 (NF2), FRMD et Kibra, respectivement) activent Hippo (Mst1 ou Mst2 chez les mammifères) qui phosphoryle Warts (Lats1 ou Lats2 chez les mammifères), lui-même phosphorylant Yki (Yap ou Taz chez les mammifères). Phosphorylées, les protéines Yki (ou Yap et Taz) ne peuvent plus entrer dans le noyau et sont inactives. L'expression des gènes contrôlant la prolifération cellulaire n'est plus activée au contraire de celle des gènes stimulant l'apop-



Figure 1

tose. Salvador (Sav) et Mats chez la drosophile, ou Mob1 chez les

mammifères, sont des co-facteurs de Hippo et Warts (Lats1 ou Lats2 chez les mammifères).

L'inactivation de Yki par Hippo est donc un mécanisme de régulation négative de la croissance et la voie Hippo peut donc être un des moyens permettant de stopper la croissance quand un organe atteint la taille requise.

La voie Hippo semble agir comme un senseur de l'état général du tissu et peut donc assurer qu'il ne croît pas au-delà d'une certaine taille. Comment cela est réalisé n'est pas connu, mais il a été établi que la voie Hippo peut être régulée, positivement ou négativement, par une grande variété de signaux, notamment des molécules de signalisation associées au cytosquelette ou à l'adhérence entre cellules. La voie Hippo intègre donc non seulement des informations chimiques mais aussi mécaniques provenant des contacts entre les cellules.

Parmi les activateurs de la voie Hippo, on retrouve des molécules de signalisation localisées soit au niveau des jonctions septées et qui agissent sur la cascade des kinases, soit au niveau du domaine apical des cellules épithéliales et qui agissent sur des régulateurs en amont de la cascade des kinases. La protéine Crumbs est un exemple de ce second type de molécules. Les cadhérines atypiques Fat et Dachsous sont également des activateurs de la voie Hippo.

Les signaux stimulant la croissance et donc inhibant la voie Hippo incluent notamment des signaux provenant du cytosquelette, apportant des informations à propos des forces mécaniques générées dans les tissus (Chapitre 9) et qui agissent sur Yki. La voie Hippo interagit également avec d'autres voies de signalisation importantes pour la régulation de la croissance et pour le développement, notamment les voies Wnt, TGF- β , BMP, Hedgehog et Notch.

La voie Hippo, *via* le co-activateur Yki, régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la croissance. Dans le disque imaginal d'aile de la drosophile, par exemple, la fonction principale de Yki est d'agir comme co-activateur du facteur de transcription Scalloped qui est essentiel à la croissance de l'aile (Section 11.22). Le complexe Yki-Scalloped active notamment la transcription de *cyclin E* (qui promeut la division cellulaire), *diap1* (qui code un inhibiteur de l'apoptose) et *bantam* (à partir duquel est produit un microARN stimulant à la fois la prolifération et la survie des cellules en supprimant la production de la protéine pro-apoptotique Hid).

La voie Hippo est très fortement conservée au cours de l'évolution et donc très similaire chez la drosophile et les vertébrés chez lesquels on retrouve deux homologues de Hippo, Mst1 et Mst2, ainsi que deux homologues de Yki, Yap et Taz (Encart 13A). Quand on inactive la voie dans le foie chez la souris, en surexprimant *Yap* ou en inactivant de manière conditionnelle *Mst1* et *Mst2*, on peut observer une augmentation d'un facteur trois ou quatre de la taille de cet organe (Fig. 13.6). Ces résultats suggèrent un rôle et un fonctionnement de la voie Hippo chez les vertébrés similaires à ceux décrits chez la drosophile. Il faut néanmoins noter qu'une inactivation conditionnelle des gènes *Mst1* et *Mst2* dans les membres en formation chez la souris ne provoque pas de modifications majeures de leur taille finale, ce qui indique qu'on ne retrouve pas la même fonction de la voie dans tous les organes.

Dans les cellules de vertébrés, la voie Hippo est activée par le contact entre cellules et est donc responsable de l'inhibition de la prolifération cellulaire qui est généralement observée dans les cultures de cellules lorsque la densité de cellules dépasse un certain seuil. La polarisation des cellules peut également activer la voie Hippo. Dans ces deux cas, la voie est activée suite à des effets directs sur les co-activateurs transcriptionnels Yap et Taz. La voie Hippo est inhibée par des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, pour G-Protein-Coupled Receptors), eux-mêmes activés par des molécules extracellulaires qui promeuvent la prolifération cellulaire, ainsi que par des informations mécaniques transmises par le cytosquelette. Celles-ci concernent notamment la rigidité de la matrice extracellulaire et la voie Hippo est donc responsable de la prolifération des cellules dépendante de leur ancrage, une autre propriété bien connue des cellules en culture. Comme chez la drosophile, la voie Hippo interagit chez les vertébrés avec d'autres voies de signalisation importantes pour la régulation de la croissance et pour le développement. Le tableau qui émerge est que la voie Hippo intègre de nombreuses informations au sujet de l'environnement des cellules d'un tissu, permettant de définir si les cellules doivent se diviser ou non et si elles doivent mourir ou non.

13.5 Les cancers peuvent être provoqués par des mutations de gènes contrôlant la prolifération cellulaire

Plus de 85 % des cancers concernent des épithéliums, ce qui n'est pas surprenant vu que beaucoup d'entre eux, par exemple l'épiderme de la peau ou l'épithélium du tube digestif, sont continuellement renouvelés à partir de cellules souches à fort pouvoir prolifératif et pouvant se diviser indéfiniment (Chapitre 8). Dans un épithélium normal, les divisions de ces cellules souches sont très strictement contrôlées et les cellules issues de ces divisions cessent elles-mêmes rapidement de se diviser. Les cellules épithéliales cancéreuses, au contraire, continuent à proliférer, pas forcément plus rapidement que les cellules normales d'ailleurs, et généralement ne se différencient pas. Les cellules cancéreuses présentent aussi souvent une instabilité génétique lors des divisions cellulaires et la perte ou le gain de chromosomes est fréquent dans les cellules des tumeurs solides.

La plupart des cancers proviennent d'une seule cellule anormale ayant acquis une série de mutations qui augmentent son taux de prolifération. La progression d'une telle cellule vers l'état de cellule tumorale maligne, ce qu'on appelle la **progression tumorale**, peut être considérée comme un processus évolutif qui inclut à la fois l'apparition de mutations additionnelles et la sélection des cellules les plus



aptes à proliférer. Une plus grande fréquence de divisions cellulaires augmente la possibilité pour une cellule d'acquérir de nouvelles mutations. L'immense majorité des cellules cancéreuses possède des mutations affectant souvent un grand nombre de gènes : ainsi, 63 mutations sont en moyenne présentes dans les cellules des cancers pancréatiques. Les gènes dont les mutations peuvent conduire à la formation de cancers peuvent être regroupés en deux grandes classes, les **proto-oncogènes** et les **gènes suppresseurs de tumeurs**.

Les proto-oncogènes codent des protéines qui stimulent, de manière régulée, la prolifération des cellules normales. Si, à cause d'une mutation ou d'un réarrangement chromosomique, ces protéines deviennent constitutivement actives ou sont produites de manière anormale (par exemple surproduites), cela peut conduire à une stimulation excessive de la prolifération cellulaire et donc contribuer à la formation d'un cancer. La mutation d'une des deux copies du gène dans une cellule peut suffire pour provoquer une prolifération incontrôlée. On connaît au moins 70 proto-oncogènes chez les mammifères, le premier à avoir été découvert étant le gène *ras* qui code une petite GTPase intervenant dans une voie de signalisation stimulant la prolifération cellulaire.

Les gènes suppresseurs de tumeurs, en revanche, codent des protéines qui inhibent la prolifération des cellules normales. L'inactivation ou la délétion des deux exemplaires d'un de ces gènes dans une cellule peut conduire à un excès de prolifération cellulaire et s'avère essentielle pour que la cellule devienne cancéreuse. Un exemple classique de gène suppresseur de tumeurs est le gène *retinoblastoma (RB)* dont le produit, la protéine RB, est un inhibiteur de la progression dans le cycle cellulaire.

Le rétinoblastome est un cancer de la rétine chez l'enfant, normalement très rare, mais pour lequel certaines familles présentent une prédisposition génétique. Chez certaines d'entre elles, cette dernière est due à une délétion d'une partie précise d'un des deux exemplaires du chromosome 13. Cette délétion, présente dans toutes les cellules du corps, ne provoque pas en elle-même de cancer de la rétine. Mais si une cellule de la rétine acquiert une délétion de la même région également sur l'autre exemplaire du chromosome 13, alors un cancer de la rétine pourra se développer. Le gène localisé dans cette région et responsable de la susceptibilité à développer un rétinoblastome est le gène *RB* mentionné ci-dessus. Les deux exemplaires de ce gène doivent être inactivés ou éliminés pour qu'une cellule devienne cancéreuse (Fig. 13.7).

Un autre gène suppresseur de tumeurs, *p53*, joue un rôle important dans de nombreux cancers, près de la moitié des tumeurs humaines présentant des versions mutées de ce gène. Il n'est pas par lui-même réellement nécessaire à un développement tumoral, mais quand une cellule subit des dommages au niveau de son ADN, il est exprimé et provoque l'arrêt du cycle cellulaire, donnant ainsi du temps à la cellule pour réparer son ADN, ou stimule la mort de la cellule si les dommages sont trop Fig. 13.7 Le gène retinoblastoma (RB) est un gène humain suppresseur de tumeurs. La délétion ou l'inactivation par mutation d'une copie seulement du gène RB ne conduit pas à la formation de tumeurs (à gauche). Si chez des individus ayant hérité d'une copie inactivée du gène RB, le second exemplaire est également supprimé ou inactivé par mutation dans une cellule de la rétine, alors cette cellule pourra produire une tumeur de la rétine (à droite). Les individus ayant hérité d'une mutation du gène RB ont donc un risque important de développer un rétinoblastome et le feront généralement pendant l'enfance. importants. Le gène *p53* est donc requis pour éviter que les cellules ne répliquent un ADN endommagé et ainsi ne produisent des cellules filles mutantes. Les formes mutantes de *p53* retrouvées dans de nombreux cancers ne peuvent plus jouer ce rôle et les cellules affectées auront tendance à accumuler des mutations.

Des gènes qui codent des composants des voies de signalisation Wnt et Hedgehog sont aussi retrouvés fréquemment mutés dans des cancers humains. Le tout premier membre de la famille des gènes Wnt identifié chez les mammifères, le gène Int-1 chez la souris, a été découvert par sa capacité à agir comme un proto-oncogène. Le gène APC (pour Adenomatous Polyposis Coli) qui code un élément clé de la voie Wnt est quant à lui un gène suppresseur de tumeurs, dont les mutations sont retrouvées dans de nombreux cancers colorectaux. La voie Wnt est nécessaire pour stimuler la prolifération des cellules souches intestinales, ainsi que de beaucoup d'autres types de cellules souches (Section 8.12). La protéine APC contribue à maintenir inhibée cette voie de signalisation en l'absence de signal Wnt (Encart 4B). Des mutations qui inactivent le gène APC, conduisent donc à une activation constitutive de la voie et à une prolifération cellulaire incontrôlée. Ces mutations sont la cause d'un syndrome héréditaire, la polypose adénomateuse familiale, (à l'origine du nom du gène) se caractérisant par la formation de très nombreux polypes au niveau du colon, initialement non cancéreux, mais pouvant évoluer en tumeurs malignes. L'inactivation d'APC ne conduit donc pas par elle-même à un cancer, mais augmente très fortement le risque que des mutations supplémentaires affectant des cellules des polypes conduisent ceux-ci à développer un cancer colorectal.

Des mutations de gènes codant des éléments de la voie de signalisation Hedgehog peuvent également conduire au développement de cancers. Des mutations du gène *Patched* qui code le récepteur du ligand Hedgehog (Encart 2F), sont la cause d'un syndrome héréditaire rare, le syndrome de Gorlin (ou nævomatose basocellulaire) qui se caractérise notamment par la prédisposition à développer des carcinomes basocellulaires épidermiques. Le gène *Patched* est un gène suppresseur de tumeurs dont le rôle de son produit est de maintenir la voie Hedgehog inactive en l'absence de ligand. Une activation anormale de la voie est retrouvée dans presque tous les cancers du pancréas, pour lesquels cette voie permettrait le maintien des cellules souches cancéreuses et interviendrait dans la progression tumorale. Des mutations d'autres gènes qui codent des éléments des voies Wnt et Hedgehog peuvent conduire indirectement à des dérégulations de la voie Hippo, qui sont observées dans de nombreuses tumeurs solides.

13.6 Les mécanismes de contrôle de la taille peuvent être différents d'un organe à l'autre

Comme il a été vu, des manipulations de la voie Hippo peuvent conduire à une augmentation spectaculaire de la taille du foie chez la souris (Fig. 13.6), mais n'ont que peu d'effets sur la taille des membres. Ceci montre que les mécanismes qui contrôlent la taille des organes chez les vertébrés diffèrent selon l'organe. Ce qui va notamment varier c'est l'importance relative des mécanismes intrinsèques de développement et de croissance de l'organe par rapport à l'influence de régulateurs extérieurs stimulant ou inhibant la croissance. On peut l'illustrer en comparant ce qui se passe dans le foie et dans le pancréas après qu'une partie de l'un ou de l'autre de ces organes a été détruite pendant le développement embryonnaire. Le foie, principal organe de détoxication chez les mammifères, peut regrossir et restaurer sa masse initiale après une lésion tant chez l'embryon que chez l'adulte. Par contre, le pancréas a une taille intrinsèquement déterminée, et sa destruction partielle chez l'embryon se soldera par la reconstitution d'un organe plus petit que la normale.

On peut réaliser des expériences montrant ces différences grâce à des lignées de souris transgéniques dans le génome desquelles a été introduit un gène codant la toxine diphtérique (Fig. 13.8). L'activité du promoteur de ce gène est contrôlée négativement par la tétracycline et n'est par ailleurs possible que dans les cellules précurseurs d'un organe cible, par exemple le foie ou le pancréas, car ce promoteur a été isolé à partir d'un gène spécifiquement exprimé dans cet organe. Si une souris gestante de cette lignée est nourrie en continu avec de la tétracycline, la toxine diphtérique ne sera pas produite dans les embryons qu'elle porte. En revanche, si on retire la tétracycline de l'alimentation de la souris au cours de la gestation, la toxine ne sera produite que



dans les cellules précurseurs de l'organe choisi, provoquant la mort de celles-ci, sans que les autres tissus ou organes des embryons soient affectés.

Plus longue est la période pendant laquelle la souris est privée de tétracycline, plus important est le nombre de cellules précurseurs tuées. Après un tel traitement, le foie embryonnaire est capable de regrossir pour atteindre une taille normale, indiquant que celle-ci n'est pas due à un nombre déterminé de divisions cellulaires des précurseurs hépatiques. En revanche, si par la même méthode des cellules pancréatiques embryonnaires sont détruites, un organe plus petit qu'à l'état normal sera obtenu (Fig. 13.8).

Cette dernière observation suggère qu'il n'existe pas de mécanisme permettant d'évaluer la taille du pancréas en formation et que la taille de cet organe est déterminée par un programme qui lui est intrinsèque. Un mécanisme possible serait que les précurseurs pancréatiques ne présentent qu'un nombre fixe de divisions, et que donc chaque précurseur ne serait capable que de produire un nombre défini de cellules filles. Un autre organe avec ce même genre de contrôle intrinsèque de la croissance est le thymus. Si on implante plusieurs thymus de fœtus dans un embryon de souris, chacun d'entre eux atteindra une taille normale. Si ce même type d'expériences est réalisé avec des rates, chacune de celles-ci croîtra beaucoup moins que dans la situation normale et la masse totale de toutes les rates implantées sera à peu près égale à celle d'une seule rate normale. Il semble donc que le foie et la rate soient capables de réguler leur taille finale par un possible mécanisme de rétrocontrôle négatif, répondant à des facteurs de l'environnement du tissu.

La régénération du foie a fait l'objet de nombreuses études chez les mammifères, en lien avec l'importance de cet organe et la fréquence des dommages qu'il peut subir. Le foie a des capacités de régénération très importantes. Suite à une intervention chirurgicale sur le foie humain, par exemple l'ablation d'une tumeur hépatique, on constate que les hépatocytes, les cellules principales du foie, commencent à se diviser un jour après l'opération. Le foie des mammifères adultes peut recouvrer une taille normale après une opération qui enlève jusqu'à deux tiers de sa masse initiale. Chez la souris et le rat, par exemple, si on retire deux des cinq lobes du foie, les trois lobes restants augmentent de taille, ce qui permet de restaurer la masse totale normale du foie. Les deux lobes excisés en revanche ne se reforment pas.

La question qui se pose est de comprendre ce qui active la croissance du foie après une ablation partielle et ce qui arrête cette croissance quand la taille initiale a été restaurée. Même si on connaît un certain nombre de facteurs de croissance impliqués dans la régénération du foie, le ou les mécanismes qui contrôlent sa taille sont encore largement inconnus. Un mécanisme de rétrocontrôle négatif pourrait peutêtre se déclencher quand le foie est assez volumineux pour exercer correctement sa fonction de récupération des acides biliaires présents dans la circulation sanguine. Ces molécules sont produites par le foie et aident à la digestion dans l'intestin grêle. Elles sont potentiellement toxiques et sont réabsorbées par les vaisseaux sanguins qui irriguent l'intestin grêle, puis transportées jusqu'au foie, où elles sont captées par les hépatocytes et réutilisées. Une augmentation de la concentration des acides biliaires dans le sang, induite en introduisant ces acides dans la nourriture de souris, signale que le foie n'est pas assez gros pour maintenir le taux normal de ces acides dans le Fig. 13.8 La destruction partielle du pancréas ou du foie embryonnaire chez la souris montre que ces organes ont des pouvoirs de régénération très différents. Une destruction cellulaire tétracyclinedépendante est réalisée à un stade précis du développement de ces organes. Le pancréas ne régénère pas après cette destruction et reste très petit, contrairement au foie qui atteint une taille quasi normale à l'état adulte malgré l'élimination d'une partie de ses cellules au cours de l'embryogenèse.

D'après Liu, J.C., Baron, J. : **Mechanisms** *limiting body growth in mammals*. Endocrine Reviews 2011, **32** : 422-440.



Fig. 13.9 Les bovins et les chiens ayant hérité des mutations inactivant le gène myostatin présentent une hypertophie musculaire. En haut, une image d'un taureau de la race bovine « Blanc bleu belge ». En bas, une image de deux lévriers whippets, celui de droite montrant une hypertrophie musculaire très nette.

Taureau : Document sous licence de Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license. Auteur : Stoolhog. Bully whippet : reproduit avec l'autorisation de S. Isett.

Fig. 13.10 La croissance post-natale normale chez l'Homme. À gauche : courbe de croissance moyenne d'un garçon après la naissance. À droite : comparaison des taux de croissance des garçons et des filles. Le taux de croissance augmente au moment de la puberté dans les deux sexes, celle des filles arrivant avant celle des garçons. sang et stimule la régénération du foie. À l'inverse, si avant l'ablation des lobes du foie, les voies biliaires sont vidées, la régénération est retardée car le taux d'acide biliaire est bas, ce qui signale que le foie est trop gros.

Un mécanisme similaire pourrait également réguler la taille du rein. L'ablation d'un des deux reins conduit à une augmentation de la taille du rein restant, peut-être à cause d'une augmentation temporaire de la concentration plasmatique de créatinine qui indique la nécessité d'augmenter la fonction rénale et donc la taille du rein. Cette augmentation de taille n'est pas due comme dans le foie à une prolifération cellulaire, mais résulte d'une augmentation en taille des cellules rénales.

Une hypothèse pour expliquer comment des organes comme le foie régule leur taille serait qu'ils produisent des molécules régulant négativement leur propre croissance. L'existence de ces molécules a été postulée il y a environ 40 ans et elles ont été appelées « chalones ». La concentration de ces molécules serait directement liée au nombre de cellules présentes dans l'organe, ce qui stopperait la croissance de l'organe quand celui-ci a atteint le nombre requis de cellules. Ces molécules n'ayant pas pu être identifiées, le concept de « chalone » est tombé en désuétude. L'intérêt pour ce concept a été ravivé plus récemment par l'identification de molécules présentant les propriétés des « chalones ». On n'a néanmoins toujours pas identifié de molécules de ce type dans le cas du foie.

Le meilleur exemple à ce jour de tissus dont la croissance est régulée par une protéine de type "chalone" est le muscle squelettique. Cette protéine est la myostatine, de la famille des molécules de signalisation TGF- β , qui est sécrétée par les myoblastes (cellules musculaires immatures ; Section 8.5) et inhibe la croissance du muscle. L'importance de cette protéine dans la régulation de la croissance du muscle a été démontrée en inactivant par mutation le gène correspondant chez la souris. Les souris chez lesquelles *myostatin* est inactif montrent une augmentation significative de leur masse musculaire, avec une augmentation du nombre et de la taille des fibres musculaires. De manière similaire, l'hypertophie musculaire retrouvée chez certains animaux domestiques, comme la race bovine "Blanc bleu belge" (Fig. 13.9) ou certaines races de mouton, est liée à l'absence de fonction du gène *myostatin*. Chez les lévriers whippets élevés pour la course, les homozygotes pour la perte de fonction de *myostatin*, appelés *Bully Whippet*, présentent une très nette hypertrophie musculaire. Néanmoins, la mutation est conservée à l'état hétérozygote dans cette race canine, la présence d'une seule copie du gène muté conférant au chien une plus grande rapidité à la course. (Fig. 13.9).

13.7 La taille globale du corps dépend de l'intensité et de la durée de la croissance

La taille globale du corps dépend à la fois du taux de croissance et de la durée pendant laquelle la croissance a lieu. La croissance observée chez l'espèce humaine pendant le développement embryonnaire et fœtal, puis pendant la période post-natale, est typique de ce qu'on observe chez les mammifères. La longueur de l'embryon humain passe d'environ 150 mm au moment de l'implantation dans l'utérus, à près de 50 cm à la fin de la gestation. Pendant les huit semaines qui suivent la fécondation, l'organisation générale du corps humain se met en place, l'embryon n'augmentant pas







significativement en taille. À l'issue de ces huit semaines, ce dernier est généralement appelé fœtus.

Le taux de croissance maximal débute autour du quatrième mois, la taille du fœtus augmentant de près de 10 cm par mois. La croissance après la naissance suit une courbe bien définie (Fig. 13.10, gauche). Au cours de la première année après la naissance, la croissance est d'environ 2 cm par mois, puis diminue très significativement jusqu'au moment de la puberté, vers 11 ans chez les filles et 13 chez les garçons, période pendant laquelle une augmentation nette du taux de croissance est à nouveau observée (Fig. 13.10, droite). C'est l'absence de ce pic de croissance au moment de la puberté qui est responsable de la petite taille adulte observée chez les Pygmées. Une diminution similaire du taux de croissance après la naissance est également observée chez d'autres mammifères, mais chez les rongeurs, par exemple, cette diminution se produit très peu de temps après la naissance.

Les différents organes et tissus ne croissent pas de la même manière pendant le développement et cela va affecter les proportions des différentes parties du corps pendant la gestation et après la naissance (Fig. 13.11). La tête de l'embryon humain représente par exemple près d'un tiers de la longueur de l'embryon à neuf semaines de développement, mais seulement un quart au moment de la naissance. Lors du développement post-natal, la tête croît moins que les autres parties du corps et ne représente plus qu'un huitième de la longueur du corps chez l'adulte.

13.8 Des hormones et des facteurs de croissance coordonnent la croissance des tissus et des organes, contribuant ainsi à déterminer la taille globale du corps

Les hormones circulantes, telles que les hormones de croissance, thyroïdiennes et stéroïdes, associées à des facteurs de croissance à action locale, ont un rôle majeur dans la coordination de la croissance et le contrôle de la taille globale du corps. La plupart des hormones ont de multiples effets sur les cellules, mais l'un de ces effets est souvent de stimuler ou d'inhiber la prolifération ou la différenciation cellulaire. La réponse à une hormone donnée différera d'un organe à l'autre et en fonction du stade de développement. Ainsi, les hormones pourront agir au niveau de la totalité du corps pour contrôler la croissance des différents organes et tissus.

La prolifération cellulaire dans l'embryon précoce des mammifères, à des stades où celui-ci n'a que quelques millimètres de long, peut être contrôlée par des facteurs de croissance sécrétés dans l'environnement extracellulaire local. Deux facteurs de croissance avec des rôles clés dans le contrôle de la croissance au cours du développement embryonnaire sont les **facteurs de croissance de type insuline**, les protéines **IGF-1** et **IGF-2** (pour *Insulin-like Growth Factors 1 et 2*). Ces protéines ressemblent fortement

Fig. 13.11 Les différentes parties du corps humain croissent de manière variable pendant le développement. A neuf semaines de gestation, la tête est relativement grande proportionnellement aux autres parties du corps mais avec le temps, cette proportion diminue à cause de la croissance plus importante de ces autres parties.

Illustration d'après Gray, H. : Gray's Anatomy. Edinburgh : Churchill-Livingstone, 1995.

ENCART 13B Le déterminant principal de la taille du corps des chiens est l'axe Hormone de croissance-IGF-1

Les chiens domestiques sont les animaux terrestres qui présentent la plus grande variation de taille. Le chien (*Canis canis*) et le loup (*Canus lupus*) sont devenus deux espèces distinctes il y a environ 15 000 ans, et des preuves archéologiques suggèrent qu'il y avait déjà des différences de taille chez les tout premiers chiens domestiques. Certaines races actuelles de chiens, comme certains lévriers ou la race appelée chiens du pharaon, ressemblent beaucoup à des chiens représentés dans des peintures d'il y a environ 8 000 ans.

Une sélection intensive menée pendant deux à trois cents ans a conduit à l'existence de plus de 350 races de chiens que nous connaissons actuellement. Ces races de chiens présentent des grandes différences de taille et de morphologie : les deux chiens montrés dans la Figure 1 l'illustrent clairement. Le mastiff, un des plus grands chiens existants, est 30 fois plus grand que le Yorkshire terrier et son poids est 50 fois celui du Chihuahua. Les chiens représentent un sujet d'étude idéal pour comprendre la base génétique de la variation de la taille : les chiens de races différentes présentent de nombreuses différences génétiques, alors qu'à l'intérieur d'une même race la variabilité génétique est au contraire très faible.

Tous les chiens domestiques possèdent un génome comportant environ 2,5 milliards de paires de bases. La séquence complète du génome d'une femelle Boxer a été déterminée et sert de génome de référence pour l'espèce. Pour identifier les régions du génome associées à des différences de tailles, des comparaisons d'ADN ont été faites entre chiens de petite taille et de grande taille de races différentes, ainsi qu'entre chiens d'une même race (chiens d'eau portugais) présentant des tailles différentes. Cette comparaison a permis d'identifier dans un premier temps une région du génome impliquée dans les différences de taille et ensuite un seul gène de cette région, le gène laf1 (Insulin-like growth factor 1) bien connu pour son rôle dans la croissance chez d'autres mammifères (Section 13.8). Ainsi, dans la race des chiens d'eau portugais, tous les individus de petite taille sont homozygotes pour un même allèle particulier du gène *lqf1* alors que ceux de plus grande taille possèdent un autre allèle. Les chiens de petite taille de cette race montrent en outre un taux plasmatique de la protéine IGF-1 plus réduit que celui retrouvé chez les chiens de grande taille. L'allèle particulier du gène *lqf1* (caractérisé par une mutation spécifique) que possèdent les chiens d'eau portugais de petite taille, est retrouvé de manière très générale chez les individus de race de chiens de petite taille (y compris dans des races éloignées les unes des autres) et quasiment jamais dans les races de chiens de grande taille tel le Saint Bernard ou le lévrier irlandais. Il est donc probable que cet allèle soit apparu très tôt dans l'histoire de la domestication du chien.

D'autres régions du génome associées aux différences de taille existent également et ont permis d'identifier cinq autres gènes qui, avec *lgf1*, rendent compte d'environ 50 % des variations de taille chez les chiens. Il s'agit notamment du gène codant le récepteur de IGF-1 et IGF-2, ainsi que celui codant le récepteur de l'hormone de croissance, ce qui est cohérent avec le modèle





Figure 1

selon lequel l'axe hormone de croissance-IGF (Sections 13.8 et 13.9) est un déterminant majeur de la taille du corps chez les mammifères. IGF-1 est un des médiateurs principaux de l'action de l'hormone de croissance qui stimule sa synthèse.

S'il y a un petit nombre de gènes associés aux différences de taille chez le chien, ce n'est pas du tout le cas dans l'espèce humaine. Dans le génome humain, 180 régions, et donc potentiellement au moins 180 gènes, sont associées à la détermination de la taille, et celles-ci ne permettent de rendre compte que de 10 % de la variation de taille dans l'espèce humaine. Une raison de cette grande différence entre cette dernière et le chien est probablement l'intense sélection artificielle de caractéristiques bien définies qui s'est appliquée chez le chien et le fait que de nombreuses races de chiens proviennent d'un petit nombre d'individus fondateurs. Ainsi, tous les Golden Retrievers actuels sont les descendants des chiots d'un seul croisement effectué dans les années 1860 entre un Yellow Retriever mâle et une Water Spaniel femelle.

Photographie de Toby par M. Welten Photographie de Roly par R. Mumford.

en terme de séquence en acides aminés à l'insuline et agissent sur les cellules grâce à une voie de transduction du signal partagée avec l'insuline. Le développement des embryons de souris ne possédant pas de gène Igf1 fonctionnel est relativement normal, mais à la naissance le poids des souriceaux est d'environ 60 % de celui de souriceaux normaux. Des souris chez lesquelles le gène *Igf2* a été inactivé présentent également un retard de croissance. Ces deux facteurs de croissance, ainsi que leurs récepteurs, peuvent être détectés chez l'embryon de souris dès le stade 8 cellules. Igf2 est un des gènes soumis à empreinte chez les mammifères (Section 10.8) : ce gène est inactif dans les cellules germinales femelles et seule la copie d'origine paternelle du gène est exprimée dans l'embryon. Comme de nombreux facteurs de croissance, IGF-1 et IGF-2 sont également importants pour la croissance post-natale et le contrôle de la prolifération cellulaire chez l'adulte. Dans l'espèce humaine, IGF-1 est produit après la naissance principalement par le foie et cette production est stimulée par l'hormone de croissance (GH pour Growth Hormone), une hormone circulante produite par l'hypophyse (Fig. 13.12). IGF-1 est aussi sécrétée par d'autres tissus en réponse à l'hormone de croissance et agit localement dans ces tissus. Le gène Igf1 et d'autres gènes codant des éléments de l'axe hormone de croissance-IGF-1 sont des déterminants majeurs de la taille chez les chiens (Encart 13B).

L'hormone de croissance est cruciale pour la croissance post-natale chez les mammifères, espèce humaine incluse. Durant la première année après la naissance, l'hypophyse commence à produire cette hormone. Un enfant présentant un déficit de production de cette hormone, croîtra moins que la normale. Si on lui donne régulièrement de l'hormone de croissance synthétique, une croissance normale peut être rétablie. La réponse initiale au traitement est très forte, ce qui permet de restaurer très rapidement une courbe de croissance normale.

La production de l'hormone de croissance par l'hypophyse dépend elle-même de deux hormones produites par l'hypothalamus et à effets antagonistes, la **GHRH** (pour *Growth Hormone-Releasing Hormone*) qui stimule la synthèse et la sécrétion de l'hormone de croissance, et la **Somatostatine** qui a l'effet inverse. Comme cela a déjà été mentionné, l'hormone de croissance exerce une bonne partie de ses effets *via* l'induction de la synthèse d'IGF-1, mais peut aussi agir directement sur certains tissus, comme les cartilages de conjugaison des os longs (Fig. 13.12). La croissance post-natale, comme la croissance embryonnaire, est donc largement contrôlée par les facteurs de croissance IGF-1 et IGF-2 et les circuits complexes hormonaux qui régulent leur production.

La puberté est initiée par l'activité de l'hypothalamus dont certains neurones vont produire de manière intermittente une hormone appelée **gonadolibérine** ou **GnRH** (pour *Gonadotropin-Releasing Hormone*). Le mécanisme qui détermine le début de la puberté n'est pas connu. L'augmentation du taux de GnRH dans le sang conduit à une forte sécrétion par l'hypophyse de gonadostimulines (aussi appelées gonadotrophines), l'hormone folliculo-stimulante ou FSH (pour *Follicle-Stimulating Hormone*) et l'hormone lutéino-stimulante ou LH (pour *Luteinizing Hormone*). Ces hormones hypophysaires provoquent elles-mêmes une augmentation de la production d'hormones stéroïdes sexuelles, les œstrogènes et les androgènes, qui sont responsables de l'augmentation du taux de l'hormone de croissance observée au moment de la puberté.

13.9 L'élongation des os longs est contrôlée par la combinaison d'un programme intrinsèque de croissance et de facteurs extracellulaires

La mise en place du plan d'organisation de l'embryon se fait à un moment où ses organes sont encore tout petits. Chez l'espèce humaine, par exemple, les membres acquièrent leur organisation générale à un stade où ils ont moins d'1 cm de long. Ces membres vont ensuite croître pendant de nombreuses années pour atteindre plus de 100 fois leur taille initiale. La croissance des membres est principalement due à l'élongation des os longs au niveau du bras : humérus, ulna (aussi appelé cubitus) et radius, et de la jambe : fémur, fibula (aussi appelé péroné) et tibia. Comment cette croissance est-elle contrôlée ?

Chaque élément squelettique de l'aile du poulet a son propre programme de croissance intrinsèque établi pendant le développement embryonnaire. Les os longs, comme l'humérus et l'ulna, apparaissent dans un premier temps sous forme d'éléments cartilagineux (l'ossification n'aura lieu que plus tard) dont la taille est similaire à celle des éléments squelettiques du poignet (Fig. 13.13). Après croissance, l'ulna et l'humérus



Fig. 13.12 La production de l'hormone de croissance est contrôlée par des hormones de l'hypothalamus. L'hormone de croissance ou GH (pour Growth Hormone) est synthétisée et sécrétée par l'hypophyse. La GHRH (pour Growth Hormone-Releasing Hormone) produite par l'hypothalamus stimule la synthèse de l'hormone de croissance alors que la somatostatine, elle aussi produite par l'hypothalamus, l'inhibe. L'hormone de croissance contrôle sa propre production grâce à des rétrocontrôles sur l'hypothalamus. L'hormone de croissance contrôle également la production de IGF-1 (pour Insulin-like Growth Factor-1) qui a un effet négatif sur la production hypophysaire de l'hormone de croissance. IGF-1 est principalement produite par le foie mais aussi par certains autres tissus où elle exerce un rôle local. La croissance des os longs est contrôlée directement par l'hormone de croissance, ainsi que par de l'IGF-1 circulante et produite localement.



Fig. 13.13 Comparaison de la croissance des éléments squelettiques dans l'aile de l'embryon de poulet. Au moment de leur formation, les éléments cartilagineux de l'humérus, de l'ulna et du poignet ont la même taille. Par la suite, les éléments squelettiques de l'humérus et de l'ulna croissent beaucoup plus que ceux du poignet. seront pourtant plusieurs fois plus grands que les os du poignet. Les programmes de croissance de ces éléments squelettiques sont spécifiés au moment où leur organisation est mise en place et fait appel à la fois à de la prolifération cellulaire et à de l'accrétion (sécrétion de matériel extracellulaire). Chaque élément squelettique suivra son propre programme de croissance, même greffé en position ectopique, à condition qu'il y ait une bonne irrigation sanguine. Les différences de croissance des diverses parties du membre sont probablement dues, au moins en partie, au fait qu'elles expriment différents gènes Hox (Section 11.13). De plus, dans les régions produisant le radius et l'ulna de l'aile du poulet (ainsi que celles produisant le tibia et la fibula dans la patte) s'exprime le gène *Short stature homeobox (Shox)*. Chez l'espèce humaine, des déficiences du gène *SHOX* sont associées au syndrome de Turner et à d'autres dysplasies squelettiques qui provoquent une réduction de la taille et se caractérisent par des avant-bras et des parties inférieures des jambes très courts.

Une fonction intrigante des hormones sexuelles, œstrogènes et testostérone, est de produire des différences dans la longueur relative des doigts entre les deux sexes. Cette croissance différentielle des doigts semble être établie pendant une courte période de temps au cours du développement et est contrôlée par des taux différents de ces hormones dans les embryons mâles et femelles (Encart 13C).

Les os longs se forment à partir d'éléments cartilagineux (Section 11.1). Pendant la croissance fœtale et post-natale, le cartilage sera remplacé par du tissu osseux, un processus appelé ossification endochondrale qui commence dans la zone centrale de l'os (appelée diaphyse) et s'étend ensuite vers ses extrémités (Fig. 13.14). Des centres d'ossification secondaire apparaissent après la naissance dans chacune des extrémités de l'os appelées épiphyses. Les os longs en croissance, que l'on peut observer chez l'enfant ou l'adolescent, sont donc formés de matière osseuse, avec du cartilage localisé au niveau des zones d'articulation (cartilages articulaires) et dans deux zones proches des extrémités de l'os, les cartilages de conjugaison (aussi appelés cartilages de croissance) où a lieu la croissance de l'os. À leur niveau, les cellules cartilagineuses (chondrocytes) sont généralement disposées en colonnes au sein desquelles peuvent être distinguées plusieurs zones. En partant de l'épiphyse osseuse, se succèdent une zone germinative qui contient des cellules souches, une zone de prolifération où les cellules se divisent, une zone de maturation, une zone d'hypertrophie dans laquelle la taille des chondrocytes augmente et enfin une zone où les chondrocytes meurent et sont remplacés par de la substance osseuse mise en place par les ostéoblastes. Ces derniers se différencient à partir de précurseurs situés dans le périchondre qui entoure le cartilage et ce processus de différenciation implique la voie de signalisation Wnt. Une similitude s'observe entre les os et la peau, dans la mesure où chez cette dernière, des cellules souches basales donnent naissance à des cellules prolifératives qui se différencient ensuite en kératinocytes qui finalement meurent (Section 8.10).

Des études chez la souris ont permis de comprendre comment est contrôlée la prolifération des chondrocytes. Deux molécules de signalisation sécrétées jouent des rôles clés dans ce contrôle, les protéines PHRP (pour *Parathyroid-Hormone-Related Protein*) et Ihh (pour *Indian Hedeghog*). Cette dernière, comme son nom l'indique, appartient à la famille des protéines Hedgehog. PHRP est sécrétée par les chondrocytes et les cellules du périchondre aux extrémités des os en formation, et stimule les chondrocytes à proliférer, ce qui les empêche d'exprimer *Ihh*. Quand les chondrocytes sortent de la zone d'influence de PHRP, ils arrêtent de se diviser, se mettent à exprimer *Ihh* et deviennent hypertrophiés (Fig. 13.15). La protéine Ihh diffuse jusqu'aux chondrocytes en prolifération et augmente encore leur taux de divisions. Ihh stimule également, par un mécanisme encore inconnu, la production de PHRP par les cellules aux extrémités des os, ce qui permet le maintien de la zone de prolifération. Enfin, Ihh agit aussi sur les cellules adjacentes du périchondre pour les induire en ostéoblastes. Des souris chez lesquelles le gène *Ihh* a été inactivé montrent une hypertrophie accélérée des chondroblastes et une absence de prolifération cellulaire, avec comme conséquence des os des membres courts et massifs.

Des hormones circulantes vont également affecter la croissance des os longs en agissant sur les cartilages de conjugaison. Les cellules souches de la zone germinale produisent le récepteur de l'hormone de croissance et la prolifération de ces cellules est probablement directement stimulée par cette hormone. Elle active également la production d'IGF-1 par les cellules des cartilages de conjugaison, ce qui stimule encore plus la croissance de l'os. Les hormones thyroïdiennes sont également nécessaires

Croissance 585



Fig. 13.14 Cartilages de conjugaison et ossification

endochondrale dans les os longs des vertébrés. Les os longs des vertébrés s'allongent par croissance au niveau des cartilages de conjugaison situés entre l'épiphyse (l'extrémité de l'os) et la diaphyse (sa partie centrale). Dans la figure, le cartilage a déjà été remplacé par du tissu osseux dans la diaphyse et du tissu osseux supplémentaire est en cours d'addition au niveau des cartilages de conjugaison. Au sein de ceux-ci, les cellules du cartilage (chondrocytes) se multiplient dans la zone de prolifération, puis maturent et deviennent hypertrophiés (agrandissement très marqué des cellules). Les chondrocytes sont ensuite remplacés par du matériau osseux produit grâce aux ostéoblastes qui dérivent des cellules du périchondre. Par l'intermédiaire de la vascularisation sanguine, des ostéoclastes envahissent la zone et sont impliquées dans la destruction du cartilage et le remodelage de l'os. Des sites secondaires d'ossification se localisent au niveau des épiphyses.

Illustration d'après Walls, G.A. : Here today, bone tomorrow. Curr. Biol. 1993, **3**:687-689.

à une croissance osseuse optimale : elles agissent en augmentant la sécrétion de l'hormone de croissance et de IGF-1, ainsi qu'en stimulant l'hypertrophie des chondrocytes. La voie de signalisation FGF au contraire limite la croissance des os. Une mutation dominante du gène *FGFR3* qui code un des récepteurs des protéines FGF, est responsable d'une maladie génétique appelée **achondroplasie** (forme de nanisme caractérisée par un raccourcissement marqué des membres). Cette mutation provoque une activité constitutive de la voie FGF, même en l'absence de ligand, ce qui conduit à une inhibition exagérée de la croissance.

Fig. 13.15 Les protéines PHRP (pour *Parathyroid-Hormone-Related Protein*) et Ihh (pour *Indian Hedeghog*) stimulent la prolifération des chondrocytes et la croissance aux extrémités des os en développement. La protéine PHRP est sécrétée par les chondrocytes aux extrémités des os longs en développement et agit sur les chondrocytes prolifératifs (en bleu) en maintenant leur prolifération et en empêchant l'expression du gène *Ihh*. Les chondrocytes plus éloignés des extrémités de l'os (en orange) échappent au signal PHRP et expriment donc *Ihh*. La protéine Ihh augmente le taux de prolifération des chondrocytes voisins et stimule les cellules du périchondre voisin à former des ostéoblastes. Par un mécanisme encore inconnu, Ihh stimule aussi la production de PHRP par les chondrocytes aux extrémités de l'os, ce qui établit un rétrocontrôle positif permettant de maintenir la production de PHRP.

Illustration d'après Kronenberg, H.M. : **Developmental regulation of the growth plate**. Nature (Insight) 2003, **423** : 332-336.



ENCART 13C Le rapport entre la longueur des doigts est déterminé lors du développement embryonnaire

Il y a plus de 100 ans, il a été remarqué que la longueur relative des doigts varie en fonction du sexe. Le quatrième doigt (l'annulaire) est généralement plus long que le second (l'index) chez les hommes, alors que chez les femmes ces deux doigts ont la même taille ou l'annulaire est plus petit que l'index. Cette différence est plus marquée au niveau de la main droite. Le rapport entre la longueur de l'index (doigt 2D) et celle de l'annulaire (doigt 4D) de la main droite constitue ce qu'on appelle l'indice 2D:4D (ou indice de Manning ou encore ratio digital) qui est généralement inférieur à 1 chez les hommes et supérieur ou égal à 1 chez les femmes (Figure 1).

Ces dernières années, il y a eu un regain d'intérêt pour l'indice 2D:4D, une valeur faible de cet indice ayant été en effet corrélée avec certaines caractéristiques comme les capacités sportives, et des troubles du développement comme l'autisme. Cet indice serait aussi un biomarqueur de certaines maladies, comme l'arthrose, plus fréquentes dans un sexe que dans l'autre.

Le dimorphisme sexuel dans la longueur des doigts est déterminé avant la naissance. Il est déjà détecté chez le fœtus humain et résulterait du degré d'exposition du fœtus à l'« hormone mâle », la testostérone. Cette hypothèse a été testée expérimentalement chez la souris chez laquelle une différence de l'indice 2D:4D entre mâle et femelle exprimée plus fortement du côté droit, comme dans l'espèce humaine, est également trouvée. Cette différence peut être observée très tôt, au moment où les cellules cartilagineuses, les chondrocytes, des doigts en formation commencent tout juste à s'hypertrophier.

Pour tester si l'indice 2D:4D est contrôlé par la testostérone et établir si les hormones sexuelles "femelles", les œstrogènes, sont aussi impliquées, des souris ont été créées chez lesquelles le gène codant le récepteur de la testostérone ou celui codant le récepteur aux œstrogènes, a été éliminé de manière conditionnelle dans le

membre en développement. La délétion du gène codant le récepteur à la testostérone conduit à une augmentation de l'indice 2D:4D dans les embryons mâles, ce qui est cohérent avec l'hypothèse que la testostérone est requise pour avoir l'indice faible propre aux mâles. Au contraire, la délétion du gène codant le récepteur aux œstrogènes conduit à une diminution de l'indice chez les embryons mâles, ce qui suggère que les œstrogènes sont requis pour obtenir un indice élevé caractéristique des femelles. La testostérone et les œstrogènes ont donc probablement des effets antagonistes sur la croissance des doigts.

Il y a une étroite fenêtre temporelle pendant laquelle la balance des hormones mâles et femelles va déterminer si l'indice 2D:4D sera de type mâle ou femelle. Le traitement de souris Figure 2





gestantes avec de la testostérone, augmente la longueur du doigt 4 chez les embryons femelles, et avec des œstrogènes, diminue la longueur du doigt 4 chez les embryons mâles. La longueur du doigt 2 n'est pas affectée dans ces expériences. Cette différence de réponse aux hormones des doigts 2 et 4 serait due au fait que les cellules du doigt 4 ont beaucoup plus de récepteurs aux œstrogènes et à la testostérone que celles du doigt 2.

Ces expériences permettent d'établir un modèle qui explique comment l'indice 2D:4D est établi au cours du développement embryonnaire. Dans les embryons femelles qui ont un taux plus élevé d'æstrogènes que de testostérone, il y a une forte activation des récepteurs aux œstrogènes dans le doigt 4, ce qui diminue la croissance de ce doigt. Dans les embryons mâles qui ont un taux plus élevé de testostérone que d'œstrogènes, il y a une forte activation des récepteurs à la testostérone dans le doigt 4 et donc une augmentation de sa croissance.



Le taux d'allongement d'un os long est égal au taux de production de nouvelles cellules par colonne multiplié par la hauteur moyenne des chondrocytes hypertrophiés. Le premier taux dépend à la fois du temps mis par les cellules pour faire un cycle de division dans la zone de croissance et de la taille de celle-ci. Les divers os longs croissent à des vitesses différentes et cela peut donc être la conséquence d'une variabilité dans la taille des zones de prolifération, dans la vitesse de prolifération et dans le degré d'agrandissement des cellules dans la zone d'hypertrophie.

Considérant la grande complexité de la régulation de la croissance des os, il est remarquable de constater que, dans l'espèce humaine, les membres gauches et droits ont une taille finale qui ne diffère que d'environ 0,2 %, alors que leur croissance s'est faite de manière indépendante pendant plus de 15 ans. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence de nombreuses colonnes cellulaires dans chaque cartilage de conjugaison, ce qui moyennerait les différences individuelles des croissances cellulaires. L'ossification des cartilages de conjugaison marque la fin de la croissance d'un os et celle-ci intervient à des moments différents selon les os, dans un ordre strict et bien défini, reflétant un âge physiologique. Le moment à partir duquel la croissance de l'os va cesser semble être une propriété intrinsèque du cartilage de conjugaison et ne pas être sous contrôle hormonal. La fin de la croissance osseuse est causée par l'arrêt de la prolifération des cellules du cartilage, dû peut-être au fait que les cellules souches chondrocytaires ne peuvent faire qu'un nombre défini et limité de divisions cellulaires.

La longueur des os longs définit celle du membre et contrôle la croissance d'autres tissus de ce dernier notamment les muscles. Le nombre de fibres musculaires striées squelettiques est déterminé pendant le développement embryonnaire. Une fois différenciées, les cellules musculaires ne se divisent plus. La croissance musculaire post-embryonnaire résulte de l'augmentation de taille des fibres musculaires en longueur et en circonférence. Pendant cette croissance, le nombre de myofibrilles au sein d'une fibre musculaire peut augmenter d'un facteur 10 et même plus. L'apport de noyaux additionnels assure le bon fonctionnement de ces cellules géantes et cela est réalisé par la fusion des fibres avec des cellules non différenciées qui leur sont adjacentes, les cellules satellites. Ces dernières constituent également une réserve de cellules souches qui permettent le remplacement de fibres musculaires endommagées (Section 8.13).

L'augmentation de la longueur d'une fibre musculaire s'accompagne d'un accroissement du nombre d'unités fonctionnelles contractiles qu'elle contient, les sarcomères. Chez la souris, par exemple, le nombre de sarcomères du muscle de la patte postérieure, le soleus, passe de 700 à 2 300 pendant les trois semaines qui suivent la naissance. Cette augmentation semble être liée à l'allongement des os longs de la patte qui exercent une tension sur le muscle *via* les tendons. Si le soleus est immobilisé en plaçant, dès la naissance, la patte dans un plâtre, le nombre de sarcomères n'augmente que très lentement tant qu'il y a le plâtre et très rapidement dès que celui-ci est retiré. Cette observation illustre la coordination mécanique qui existe entre la croissance des os et celle des muscles.

13.10 La quantité de nourriture reçue par un embryon peut avoir des effets importants à très long terme

Aucun animal ne pourra atteindre sa taille finale potentielle s'il n'a pas été correctement nourri pendant sa croissance embryonnaire et post-natale. Chez les mammifères, une nutrition insuffisante ou inadéquate affecte non seulement la croissance embryonnaire et fœtale, mais peut également avoir des effets néfastes, et parfois inattendus, sur la vie adulte. Des études populationnelles menées dans des pays développés comme la Grande-Bretagne, ont mis en évidence qu'un déficit en taille ou en poids à la naissance (dû à la malnutrition de la mère ou à une naissance prématurée) ou pendant la petite enfance, était associé à un risque accru d'avoir pendant la vie adulte une maladie coronarienne, du diabète de type 2 ou un accident vasculaire cérébral.

Si une période de sous-nutrition pendant le développement précoce est suivie d'une période où la nutrition s'améliore, que ce soit pendant la gestation ou après la naissance, une phase de « rattrapage » de croissance pourra se faire au détriment de la maintenance et de la réparation des tissus et organes, les ressources du corps étant limitées. Les enfants prépubères nés prématurément sont plus susceptibles d'avoir une intolérance à l'insuline et au glucose que les autres enfants du même âge, intolérance qui peut se maintenir à l'état adulte, évoluer vers du diabète et s'accompagner d'hypertension. La croissance de « rattrapage » qui survient après une mauvaise nutrition ou une naissance prématurée semble également prédisposer à la surcharge pondérale et même à l'obésité. Une explication possible serait qu'en cas de malnutrition *in utero*, le fœtus accumule plus d'adipocytes, à titre de précaution, que lorsque la nutrition est correcte, ce qui peut s'avérer positif en cas de malnutrition après la naissance, mais avoir des conséquences néfastes en cas de nutrition riche.

Des expériences chez les animaux confirment ces observations faites chez l'espèce humaine. Des embryons de ratte gestante qui ont reçu une alimentation pauvre en protéines (mais avec un nombre normal de calories totales) pendant la période pré-implantatoire (de 0 à 4,5 jours), montrent un développement anormal de nombreux organes. À la naissance, les ratons ont un poids faible, montrent par la suite une croissance post-natale plus forte que la normale et deviennent des adultes avec de l'hypertension.

L'obésité est associée à de nombreuses affections comme le diabète de type 2 ou des maladies cardio-vasculaires. Même si elle est principalement due à une alimentation excessive et un manque d'exercices physiques, l'obésité peut aussi être liée à l'état nutritionnel lors du développement précoce et à des prédispositions génétiques. Les tissus adipeux humains, principalement localisés sous la peau, contiennent environ 40 milliards d'adipocytes. Chez les personnes obèses, on observe une augmentation à la fois du nombre d'adipocytes et de la taille de ceux-ci à cause d'un dépôt excessif de lipides dans ces cellules. Le nouveau-né possède un certain nombre d'adipocytes, généralement un peu plus chez les filles que chez les garçons. Le nombre d'adipocytes augmente à la fin de l'enfance et au début de la puberté, et n'évolue plus vraiment par la suite. Le nombre d'adipocytes augmente plus vite chez les enfants vraiment obèses que chez les enfants minces et le nombre final d'adipocytes sera plus grand chez les premiers ayant atteint l'âge adulte. Une fois qu'un adipocyte apparaît, il subsistera généralement pendant toute la vie. Les adipocytes ne meurent en effet que rarement et le tissu adipeux ne connaît qu'un faible renouvellement au cours de la vie : chaque mois environ 1 % des cellules adipeuses meurent et sont remplacées. L'obésité chez l'adulte est donc très souvent liée à une obésité infantile.

RÉSUMÉ

La croissance chez les animaux survient principalement après que le plan d'organisation générale a été établi et débute alors que les organes sont encore très petits. La taille finale des organes peut être contrôlée par des signaux externes à ces organes et par des programmes intrinsèques de croissance. Dans certains cas, la taille de l'organe peut être déterminée en contrôlant les dimensions de l'organe en croissance plutôt qu'en fixant le nombre de cellules ou leur taille. Chez les animaux, la croissance peut être due à une multiplication cellulaire, à un agrandissement des cellules ou à la sécrétion de grande quantité de matériel extracellulaire. La voie de signalisation Hippo intègre de multiples informations provenant de l'environnement tissulaire, inhibe la prolifération cellulaire et stimule la mort des cellules en excès. Le cancer est le résultat d'une perte de contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire. Chez les mammifères, les facteurs de croissance IGF-1 et IGF-2 sont requis pour la croissance embryonnaire et modèrent les effets de l'hormone de croissance après la naissance. Cette hormone, produite par l'hypophyse, a un effet majeur sur la croissance post-natale humaine. La croissance des os longs dépend des effets combinés sur les cartilages de conjugaison d'un programme intrinsèque de croissance, de signaux locaux et de l'hormone de croissance.

Mue et métamorphose

Chez de très nombreux animaux, le développement embryonnaire aboutit à la formation d'une larve qui sera à l'origine de la forme adulte grâce à une phase de transformation appelée métamorphose. Les changements qui se produisent pendant cette phase peuvent être très importants et rapides, les exemples les plus classiques étant la métamorphose de la chenille en papillon, celle de l'asticot en mouche ou encore celle du têtard en grenouille. On peut également citer la métamorphose chez l'oursin de la larve pluteus en adulte (Fig. 6.19). Dans certains cas, la larve et l'adulte ont peu de ressemblance. C'est le cas notamment chez les mouches comme la drosophile dont les structures adultes dérivent de disques imaginaux et sont donc absentes de la larve (Chapitres 2 et 11). Chez les grenouilles, même s'il en existe bien d'autres, les changements morphologiques les plus évidents se déroulant pendant la métamorphose, sont la disparition de la queue du têtard et la formation des pattes. Chez certains insectes, c'est la totalité de l'organisation du corps qui se modifie lors de la métamorphose, la plupart des tissus larvaires disparaissant et étant remplacés par des tissus adultes élaborés à partir des disques imaginaux et des histoblastes. Chez les arthropodes et les nématodes, l'augmentation de taille aux stades larvaires et pré-adultes nécessitent le remplacement de la cuticule, qui est rigide, par une nouvelle cuticule plus grande, par un processus appelé **mue**.

Un certain nombre de caractéristiques diffèrent entre les développements embryonnaire et post-embryonnaire. Pendant le développement précoce, les molécules de signalisation sont généralement des facteurs de croissance et agissent à courte distance, alors que durant le développement post-embryonnaire, de nombreuses molécules de signalisation, de nature pas forcément protéique, sont produites par des glandes endocrines spécialisées et agissent à longue distance. La synthèse de ces hormones est contrôlée par le système nerveux central en réponse à des informations environnementales. La régulation de la production de ces hormones fait également souvent appel à des rétrocontrôles complexes.

13.11 Les arthropodes doivent muer pour pouvoir croître

Les arthropodes ont un exosquelette, la cuticule, qui est sécrété par les cellules de l'épiderme. La rigidité de cet exosquelette empêche toute croissance progressive de la taille de l'animal. Celui-ci grandira donc par étapes qui sont associées au remplacement de l'ancienne cuticule par une nouvelle plus grande. Ce processus est appelé **mue** (appelée *ecdysis* en anglais). Les mues séparent les stades larvaires, au nombre de trois par exemple chez la drosophile. La croissance au moment de la mue peut être très importante, comme le montre la Fig. 13.16 pour le sphinx du tabac, *Manduca sexta*.

Au début de la mue, l'épiderme se sépare de la cuticule par un processus appelé apolyse et un liquide, le liquide exuvial, est sécrété dans l'espace entre la cuticule et l'épiderme (Fig. 13.17). Ensuite, la surface de l'épiderme s'accroît par multiplication cellulaire et augmentation de la taille des cellules. L'épiderme se plisse et commence à sécréter une nouvelle cuticule. L'ancienne cuticule, partiellement digérée par des enzymes présentes dans le liquide exuvial, se déchire et est éliminée.

La mue est sous contrôle hormonal. Des récepteurs d'étirement sensibles à la taille du corps sont activés par la croissance de l'animal et cela provoque la sécrétion par le cerveau de l'**hormone prothoracotrope** ou **PTTH** (pour *Prothoracicotropic Hormone*). Cette hormone agit sur la glande prothoracique qui répond en sécrétant une hormone stéroïde, l'**ecdysone**, responsable de la mue. Ce même circuit hormonal est également impliqué dans le contrôle de la métamorphose.

13.12 La taille du corps des insectes est déterminée par la vitesse et la durée de la croissance larvaire

Quand une larve d'insecte a atteint un certain stade, par exemple la fin du troisième stade larvaire chez la drosophile, elle ne croît et ne mue plus, mais débute une transformation beaucoup plus radicale, la métamorphose en adulte. De nombreux tissus et organes larvaires, tels le tube digestif, les glandes salivaires et certains muscles, disparaissent suite à des processus apoptotiques, et d'autres, comme le système nerveux, sont profondément remodelés. Les disques imaginaux se développent en appendices adultes rudimentaires, notamment les pattes, les ailes et les antennes.



Fig. 13.16 Croissance et mue de la chenille du sphynx du tabac (Manduca

sexta). La chenille de ce papillon subit une série de mues à l'origine de plusieurs stades larvaires (numérotés de 1 à 5 sur l'image) depuis la minuscule larve qui est produite à la fin du développement embryonnaire (1 ; indiquée par la flèche) jusqu'à la larve prête à se métamorphoser (5). À chaque mue, la larve double approximativement sa taille. Les chenilles se trouvent sur un bloc de nourriture. Barre d'échelle = 1 cm.

Photographie aimablement communiquée par S.E. Reynolds.

Fig. 13.17 Mue et croissance de l'épiderme chez les arthropodes. La cuticule est sécrétée par l'épiderme. Au début de la mue, l'épiderme se sépare de la cuticule (apolyse) et un liquide exuvial est sécrété dans l'espace qui les sépare. L'épiderme croît, se plisse et commence à sécréter une nouvelle cuticule. Des enzymes contenues dans le liquide exuvial fragilisent l'ancienne cuticule qui sera éliminée.



Fig. 13.18 Métamorphose des

insectes. Les corpora allata de la larve de papillon sécrètent l'hormone juvénile qui inhibe la métamorphose. En réponse à des changements environnementaux, par exemple une augmentation de la lumière ou de la température, les cellules neurosécrétrices du cerveau de la larve du dernier stade larvaire commencent à sécréter l'hormone prothoracotrope (PTTH), qui libérée à partir des corpora allata, va agir sur la glande prothoracique en stimulant la sécrétion d'ecdysone. Cette dernière, en surpassant l'activité inhibitrice de l'hormone juvénile, provoque l'initiation de la métamorphose.

Illustration d'après Tata, J.R. : Gene expression during metamorphosis : an ideal model for post-embryonic development. BioEssays 1993, 15 : 239-248.



La croissance a uniquement lieu pendant les stades larvaires et la taille de l'adulte est donc déterminée par la taille qu'a atteint la larve au moment où elle cesse de s'alimenter et entame sa métamorphose. La larve devient alors une **nymphe**, appelée chrysalide chez les papillons et pupe chez les diptères. Dans des circonstances normales, la larve se métamorphose quand elle atteint une taille donnée, déterminée génétiquement et typique de son espèce. Si expérimentalement la durée de la vie larvaire est prolongée ou réduite, des adultes, respectivement plus grands ou plus petits que la normale sont obtenus. Le contrôle de l'initiation du stade nymphal et la stimulation de la métamorphose s'effectue par les hormones PTTH et ecdysone, déjà mentionnées pour leur rôle dans la mue, une autre hormone, **l'hormone juvénile** ou JH (pour *Juvenile Hormone*) ayant une activité inhibitrice (Fig. 13.18).

Comment la taille du corps est-elle mesurée par la larve d'insecte et comment est défini le moment d'initiation de la métamorphose, sont des questions pour lesquelles nous n'avons que des réponses partielles et ces réponses ne sont pas les mêmes d'un groupe d'insectes à un autre. Chez la drosophile, par exemple, la larve doit atteindre une taille minimale critique, sans quoi elle ne survivra pas à la métamorphose. Dans des conditions normales, cette taille est atteinte à peu près au milieu du troisième et dernier stade larvaire, période où se manifeste une poussée d'ecdysone. La larve continue à se nourrir et à croître jusqu'au moment de sa tranformation en pupe (Fig. 13.19). Si la larve est sous-alimentée après avoir atteint la taille critique, sa croissance s'arrête car celle-ci est dépendante de l'alimentation. Si la larve est sous-alimentée pendant tout le troisième stade larvaire, la croissance est ralentie : la larve prend plus de temps pour atteindre la taille minimale critique pour se métamorphoser et la période de croissance après avoir atteint cette taille critique (période de croissance terminale ou PCT) est également fortement rallongée (Fig. 13.19). La métamorphose sera donc retardée, mais la larve et donc l'adulte aura une taille finale normale.

La larve du papillon de nuit *Manduca* doit également avoir une taille critique minimale, atteinte vers la moitié du dernier stade larvaire, pour pouvoir se métamorphoser. Cependant, comme pour les autres papillons, la poussée d'ecdysone au moment de la taille critique est provoquée par une chute du niveau d'une autre hormone, l'hormone juvénile, produite par une paire de glandes endocrines situées près du cerveau, les *corpora allata*. Comme son nom l'indique, l'hormone juvénile maintient l'état larvaire et inhibe la métamorphose. Chez *Manduca*, contrairement à la drosophile, la durée de la période de croissance terminale est constante et ne dépend pas de la nutrition. Par conséquent, si durant son dernier stade larvaire, la larve est sous-alimentée, un adulte de taille réduite sera formée (Fig. 13.19)




Chez la drosophile, en revanche, la durée de la croissance terminale dépend de la nutrition. Le retard apporté au déclenchement du stade nymphal quand la larve est sous-alimentée est dû à une régulation négative de la voie TOR dans la glande prothoracique, qui a pour conséquence de maintenir à une valeur basse le taux d'ecdysone. Comme la larve va quand même finalement se métamorphoser, cela veut dire qu'un taux faible d'ecdysone sur une longue période de temps peut avoir le même effet déclencheur sur la métamorphose qu'une élévation brutale du taux de cette hormone.

La voie TOR est une voie de signalisation qui contrôle la taille des cellules et dont l'activité dépend de l'état de nutrition de l'organisme (Fig. 13.3). C'est l'activité de cette voie dans un tissu larvaire particulier, le corps gras, qui va permettre à la larve de drosophile d'adapter sa croissance aux conditions nutritionnelles. Suite à l'activation de la voie TOR, le corps gras émet un signal encore inconnu qui va stimuler des cellules neurosécrétrices du cerveau à produire des peptides de type insuline. Ces peptides circulent dans l'hémolymphe de la larve et stimulent la croissance *via* une voie de signalisation qui ressemble beaucoup à celle de l'insuline/IGF des vertébrés, mentionnée auparavant dans ce chapitre (Encart 13B). Les peptides de type insuline circulant dans l'hémolymphe de la larve de drosophile agissent notamment sur la glande prothoracique où elles activent la voie de signalisation TOR qui elle-même régule positivement la synthèse d'ecdysone. La production de cette dernière dépend également de la PTTH produite par le cerveau et dont la sécrétion pourra dépendre de facteurs environnementaux comme la température et la lumière.

Fig. 13.19 Régulation de la taille des insectes en fonction de la nutrition. Le niveau de nutrition pendant la vie larvaire influence de manière différente la taille de l'adulte chez la drosophile et Manduca. En haut : chez la drosophile, après que la larve a atteint une taille critique, une nutrition pauvre provoque le prolongement de la période de croissance terminale (PCT) permettant à la larve d'obtenir une taille normale. L'adulte formé à l'issue de la métamorphose est alors de taille normale. En bas : chez le papillon, la durée de la PCT est la même en cas de nutrition pauvre ou riche. La croissance étant plus faible en cas de nutrition pauvre, un adulte de plus petite taille sera produit.

D'après Nijhout, H.F. : **Size matters (but so does time), and it's OK to be different**. Dev. Cell, 2008, **15** : 491-492.



Fig. 13.20 L'activité transcriptionnelle des gènes est repérable sous forme de *puffs* sur les chromosomes polytènes des larves de drosophile. Région identique d'un chromosome d'une larve au début (à gauche) ou à la fin (à gauche) du troisième stade larvaire. On peut voir, sur le chromosome de droite, trois *puffs* (indiqués par des flèches) qui ont été induits par l'ecdysone. *Photoaraphie aimablement communiauée par M. Ashburner.*

L'ecdysone traverse les membranes plasmiques et interagit avec des récepteurs intracellulaires de la grande famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Ces récepteurs, comme ceux de l'acide rétinoïque (Encart 5C), sont des facteurs de transcription qui sont activés par la liaison de leur ligand hormonal. Le complexe formé par l'hormone et son récepteur se fixe au niveau des régions régulatrices de nombreux gènes, et provoque des expressions géniques nouvelles accompagnant la métamorphose.

Chez la drosophile, ce sont plusieurs centaines de gènes dont l'expression va changer au moment de la métamorphose. Ces changements transcriptionnels sont visibles au niveau des chromosomes polytènes que l'on retrouve dans certains tissus larvaires comme les glandes salivaires. Les cellules de ces tissus, en effet, répliquent de manière répétée leur ADN sans que cette réplication soit suivie de divisions cellulaires - on parle généralement d'endoréplication pour désigner ce phénomène. Ces cellules deviennent très grandes et contiennent parfois plusieurs milliers d'exemplaires de leurs molécules d'ADN. Dans les glandes salivaires, les multiples chromatides restent appariées et forment des chromosomes polytènes « géants ». Les zones transcriptionnellement actives de ces chromosomes peuvent être visualisées facilement en microscopie optique car ils apparaissent sous forme de renflements localisés appelés généralement puffs (on parle aussi parfois de nodules chromosomiques ou d'anneaux de Balbiani ; Fig. 13.20). Le *puff* représente une zone de chromatine décondensée à laquelle une activité transcriptionnelle est associée. Quand le gène n'est plus transcrit, le puff disparaît. À la fin de la vie larvaire, un grand nombre de puffs apparaissent dans un ordre bien précis sous l'influence directe de l'ecdysone.

13.13 La métamorphose des amphibiens est sous contrôle hormonal

Une métamorphose survient également dans beaucoup de groupes d'animaux autres que les arthropodes, notamment chez les amphibiens. Chez ces derniers, le déclenchement de la métamorphose est contrôlé à la fois par des facteurs environnementaux, comme la nutrition, la lumière ou la température, et par le programme de développement interne de l'animal. Ces différents facteurs exercent leurs effets en agissant sur des cellules neurosécrétrices de l'hypothalamus qui sécrètent une hormone appelée corticolibérine ou CRH (pour Corticotropin-releasing hormone) qui elle-même stimule des cellules de l'hypophyse à produire de la thyréostimuline ou TSH (pour Thyroid-Stimulating Hormone; aussi appelée thyrotropin). Il est à noter que l'action de CRH est propre aux vertébrés non mammaliens et aux amphibiens à l'état larvaire ; en effet, chez les mammifères et chez les grenouilles adultes, la libération de TSH n'est pas due à CRH mais à une autre hormone appelée thyréolibérine ou TRH (pour Thyrotropin-Releasing Hormone). La thyréostimuline agit sur la glande thyroïde en stimulant la sécrétion des hormones thyroïdiennes, la triiodothyronine (T3) et la tétraiodothyronine (T4 ; aussi appelée thyroxine), qui provoquent le déclenchement de la métamorphose (Fig. 13.21). Ce sont des hormones d'origine ancienne présentes même chez les plantes. Quoique de structure chimique très différente de l'ecdysone, elles sont également capables de traverser les membranes plasmiques et d'interagir avec des récepteurs intracellulaires apparentés à ceux des hormones stéroïdes et de l'acide rétinoïque (Encart 5C). L'hypophyse produit aussi une hormone peptidique, la prolactine, qui fut longtemps considérée comme un inhibiteur de la métamorphose, alors que son hyperproduction ne prolonge pas la vie du têtard, mais réduit la régression de la queue du têtard.

Une caractéristique remarquable des hormones qui stimulent la métamorphose est que celles-ci affectent non seulement une large variété de tissus, mais aussi que leurs effets sur ces derniers peuvent être très variables en intensité. Dans les membres du têtard en métamorphose, par exemple, les hormones thyroïdiennes stimulent le développement et la croissance, alors que dans la queue elles stimulent la mort cellulaire et la dégénérescence de la structure caudale, les muscles rapides disparaissant en premier, suivis de la chorde. Dans tous les tissus, les hormones thyroïdiennes agissent *via* le même récepteur intracellulaire, mais le complexe récepteur/hormone régulera



des ensembles différents de gènes et aura donc des effets variables en fonction du type de cellules et de tissus. Certains de ces effets peuvent être reproduits en culture : l'exposition à des hormones thyroïdiennes de queues de têtard de xénope excisées et mises en culture, provoque de la mort cellulaire et une complète régression des tissus caudaux. La métamorphose modifie également la capacité des cellules à répondre à d'autres signaux hormonaux : ainsi, chez le xénope, les œstrogènes ne stimulent la synthèse de la vitellogénine, une protéine qui est un constituant majeur du vitellus de l'œuf, qu'après que la métamorphose a eu lieu et que la maturité sexuelle a été atteinte.

RÉSUMÉ

Les larves d'arthropodes croissent en subissant une série d'étapes de mues pendant lesquelles leur ancienne cuticule rigide est éliminée et remplacée par une nouvelle plus grande. La métamorphose peut aboutir à des modifications radicales de la morphologie de l'animal. Chez les insectes, par exemple, les individus avant (larves) et après (adultes) métamorphose ne présentent que peu de similitudes morphologiques. Ces différences sont en revanche moins marquées chez d'autres animaux comme les amphibiens. La métamorphose est contrôlée par des facteurs environnementaux et hormonaux. Les hormones thyroïdiennes et l'ecdysone provoquent la métamorphose respectivement chez les amphibiens et les insectes. Chez ces derniers, la taille de l'adulte est déterminée par celle atteinte par la larve au moment où elle débute sa métamorphose. Chez la drosophile, la transcription des gènes lors de la métamorphose peut être visualisée par l'apparition de *puffs* localisés sur les chromosomes géants polytènes.

Régénération

La régénération est la réparation et le remplacement de parties corporelles perdues. Comme cela a été vu précédemment (voir Chapitres 4 et 5), beaucoup d'embryons d'animaux possèdent un pouvoir de régulation, mais la capacité de régénérer et de former correctement des tissus et des organes manquants est beaucoup plus rare chez les adultes. À l'inverse, les plantes peuvent très bien régénérer, et c'est la raison pour laquelle le bouturage par exemple permet l'obtention d'une nouvelle plante complète (Chapitre 7). Fig. 13.21 Contrôle hormonal de la métamorphose chez les amphibiens. Des changements dans les conditions de l'environnement provoquent la sécrétion de corticolibérine (CRH) par l'hypothalamus larvaire. Cette hormone agit sur l'hypophyse et la stimule à produire la thyréostimuline (TSH) qui à son tour provoque la sécrétion d'hormones thyroïdiennes, la triiodothyronine (T3) et la tétraiodothyronine (T4), qui stimulent la métamorphose. Ces hormones exercent un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus et l'hypophyse en les stimulant à continuer la production de CRH et TRH. L'hypophyse produit aussi une autre hormone, la prolactine, qui était traditionnellement considérée comme un inhibiteur de la métamorphose.

Illustration d'après Tata, J.R. : Gene expression during metamorphosis : an ideal model for post-embryonic development. BioEssays 1993, 15 : 239-248.



Chez les animaux terrestres, la croissance à la fois chez l'embryon et durant la période post-natale détermine la taille finale de l'adulte et de celle de ses différentes parties corporelles, ainsi que leur forme. Une fois la taille adulte atteinte, la croissance s'arrête. Mais comme il a été vu, certains organes comme le foie, peuvent régénérer chez les mammifères, même adultes. Les parties manquantes de cet organe ne sont, en fait, pas remplacées, la masse tissulaire initiale étant restaurée par une augmentation de volume des parties restantes. En revanche, certains insectes et autres arthropodes, ainsi que quelques vertébrés, peuvent régénérer de nouveaux organes pleinement fonctionnels. Des pattes peuvent ainsi régénérer chez les insectes et les amphibiens urodèles tels que les tritons et l'axolotl, la salamandre mexicaine Ambystoma mexicanum. Ces amphibiens, même à l'état adulte, peuvent de façon remarquable régénérer non seulement leurs membres, mais aussi leur queue et quelques organes internes (Fig. 13.22). La régénération du cristallin à partir de l'épithélium pigmenté de l'iris, chez le triton, constitue un exemple de transdifférenciation (voir Fig. 8.32). Par contre, chez les grenouilles (amphibiens anoures), si une régénération est possible durant les stades larvaires, ce pouvoir est généralement perdu avec la métamorphose. Un autre vertébré, le poisson-zèbre, est capable à l'état adulte, de régénérer ses nageoires et même son cœur après ablation d'une partie du ventricule. Les mammifères sont en revanche dans l'incapacité de régénérer un membre perdu ou leur cœur, même s'ils ont la capacité de remplacer la toute extrémité de leurs doigts.

De manière générale, l'efficacité à réparer une lésion décroît avec l'âge et cela paraît également valable pour la capacité de régénérer. Cependant, de manière inattendue, il a été montré récemment que la régénération du cristallin du triton peut se répéter plusieurs fois et que cette restauration ne diminuait pas avec l'âge. Dans une expérience menée sur le long terme, une régénération complète du cristallin, a encore été observée chez un animal de 30 ans, après 18 prélèvements.

Quelques non-vertébrés présentent également une grande aptitude à régénérer : des petits fragments d'animaux tels que ceux d'étoiles de mer, de planaires (vers plats) et de l'hydre (*Hydra*) peuvent permettre la reconstitution d'un animal entier (Fig. 13.23). Cette propriété peut être reliée au fait que ces animaux sont aptes à se reproduire de manière asexuée, en étant en effet capables de donner naissance à un nouvel individu complet par bourgeonnement ou scissiparité.

La régénération soulève plusieurs questions majeures. Quelle est l'origine des cellules qui donnent naissance aux structures régénérées ? Quels sont les mécanismes



Fig. 13.22 La capacité de régénération chez les amphibiens urodèles. Le triton empereur peut régénérer sa crête dorsale (1), ses pattes (2), sa rétine et son cristallin (3 et 4), ses mâchoires (5) et sa queue (non représentée).



qui gouvernent la reconstruction du tissu régénéré et comment ces derniers sont-ils reliés aux processus qui se manifestent au cours du développement embryonnaire ?

Il sera surtout traité ici de la régénération des pattes chez les amphibiens urodèles (tritons et axolotl) et les insectes. Une brève attention sera également portée à celle du muscle cardiaque chez le poisson-zèbre. La compréhension de la régénération dans ces systèmes modèles pourrait aider à trouver comment stimuler cette dernière dans les tissus de mammifères et ainsi développer, à des fins médicales, la réparation tissulaire notamment cardiaque. Il y a également la question de savoir si les cellules souches sont impliquées dans la régénération, et dans ce cas, lesquelles pourraient être utilisées pour aider à la réparation de tissus lésés (Chapitre 8).

13.14 Il existe deux types de régénération, la morphallaxie et l'épimorphose

La régénération requiert, au minimum, la production de cellules dont la croissance, la différenciation et l'agencement sont régulés. Une distinction a été établie entre deux types de régénération. Pour l'un, la morphallaxie, il y a peu de nouvelles divisions cellulaires et de croissance, et la régénération des structures se réalise par une reconfiguration de tissus pré-existants et le rétablissement de limites corporelles. La régénération de la totalité du corps de l'hydre, cnidaire d'eau douce, est un bon exemple de morphallaxie (Encart 13D). À l'inverse, la régénération d'une patte de triton dépend de la croissance d'une structure complètement nouvelle et correctement ordonnancée, et correspond à un cas d'épimorphose. Ces deux types de régénération peuvent être illustrés en prenant le modèle du drapeau français (Fig. 13.24). Dans la morphallaxie, de nouvelles limites régionales sont d'abord établies et, rattachées à elles, de nouvelles valeurs de position sont spécifiées ; dans l'épimorphose, les nouvelles valeurs de position sont liées à la croissance s'effectuant à partir de la zone d'ablation. Chez les planaires, une population de cellules souches adultes, présentes dans l'ensemble du corps, est à l'origine du tissu régénéré (Encart 13E), et la régénération implique à la fois la morphallaxie et l'épimorphose.

13.15 La régénération des pattes chez les amphibiens et les insectes implique l'épimorphose

Les amphibiens urodèles montrent une remarquable capacité à régénérer des structures corporelles telles que queue, pattes, mâchoires et cristallins (voir Fig. 13.22). La régénération de ces structures implique une prolifération cellulaire et un nouveau processus de croissance, et est ainsi du type épimorphique. La régénération d'une structure aussi organisée qu'une patte de vertébré adulte, qui comporte des cellules complètement différenciées et de types variés, soulève la question de l'origine des cellules qui donneront naissance à la structure régénérée. Les cellules différenciées se dédifférencient-elles et commencent-elles à se diviser ? Constituent-elles une réserve de cellules particulières ? Existe-t-il des cellules qui changent de caractéristiques en se dédifférenciant ? La régénération, qui chez les insectes s'avère possible pour des pattes et d'autres appendices lésés, a été principalement étudiée chez la blatte dont les pattes sont assez grandes pour être manipulées et ce système fera l'objet ici d'une brève discussion. Fig. 13.23 Régénération chez quelques non vertébrés. Une planaire, une hydre et une étoile de mer montrent toutes de remarquables capacités à régénérer. Quand des parties corporelles sont prélevées ou qu'un petit fragment est isolé, un animal entier peut se reconstituer.



Fig. 13.24 Morphallaxie et épimorphose. Un modèle tel que celui du drapeau français peut être spécifié par un gradient de valeurs de position (voir Fig. 1.26). Si une section de moitié est pratiquée, une régénération peut se réaliser selon deux processus : par morphallaxie, une nouvelle limite est établie au niveau de la section et les valeurs de position sont entièrement modifiées ; et par épimorphose, de nouvelles valeurs de position sont établies, en lien avec la croissance s'effectuant à partir de la coupure.

ENCART 13D Régénération de l'hydre



Figure 1

Photographie reproduite avec la permission de Müller, W.A. : **Diacylglycerol-induced multihead formation in Hydra**. Development. 1989, **105 :** 309-316. Publiée avec l'autorisation de The Company of Biologists Ltd.

La remarquable capacité de l'hydre, petit cnidaire d'eau douce du genre *Hydra*, à régénérer ses régions corporelles manquantes quand elle est sectionnée transversalement a été découverte il y a plus de 200 ans. La régénération de l'hydre ne nécessite pas une croissance ou une prolifération cellulaire et elle constitue un bon exemple de morphallaxie (voir Section 13.14). Dans ce type de régénération, le tissu restant est remanié de manière à remplacer la région manquante. La régénération de l'hydre a également été un important modèle pour tester le principe de l'information de position.

L'organisation corporelle de l'hydre est celle d'un tube creux d'environ 0,5 cm de long. Ce dernier possède une polarité antéro-postérieure nettement visible avec une région céphalique à une extrémité et une sole basale à l'autre par laquelle se fait l'adhérence à un support (Figure 1). La tête consiste en un hypostome conique au niveau duquel se situe un orifice en communication avec le tube digestif et qu'entourent de nombreux tentacules. À la différence de la plupart des espèces évoquées dans l'ouvrage, qui possèdent 3 feuillets embryonnaires, l'hydre n'en possède que deux. La paroi corporelle est constituée d'un épithélium externe, et un épithélium interne délimitant la cavité gastrique, correspondant, respectivement, à l'ectoderme et à l'endoderme. Ces deux feuillets sont séparés par une structure gélatineuse ou mésoglée. Il existe aussi une population de cellules souches multipotentes, les cellules interstitielles, à l'origine d'une vingtaine de types cellulaires spécialisés, incluant les neurones, les cellules sécrétrices et les cellules urticantes, ou nématocytes, qui sont utilisées pour la capture des proies. L'hydre est dépourvue de système nerveux central, mais possède un réseau de neurones distribués dans l'ensemble du corps.

L'hydre est en croissance continue en raison d'un renouvellement dynamique cellulaire. Les cellules ecto- et endodermiques de la région gastrique du corps se divisent tous les 3-4 jours et les cellules filles se déplacent vers la tête ou la queue, régions où soit elles sont éliminées, soit elles participent à la formation de bourgeons. Les cellules interstitielles de la région gastrique se



Figure 2

renouvellent aussi mais plus rapidement. Les cellules d'un animal adulte changent donc continuellement leurs positions relatives et forment de nouvelles structures au fur et à mesure de leur montée ou descente au sein de la colonne corporelle. Les cellules sont réorganisées au cours de ce phénomène dynamique, ce qui donne à l'hydre sa remarquable capacité à régénérer.

Si la colonne gastrique est sectionnée transversalement, la partie inférieure régénère une tête et la supérieure reconstitue une sole pédieuse. Deux petites hydres sont ainsi produites, chacune d'elle ayant pour taille la moitié de celle de l'animal d'origine. Plus spectaculaire est le fait qu'un mélange de cellules dissociées d'une hydre est capable de reconstituer un animal. Une hydre fortement irradiée, chez laquelle les divisions cellulaires sont abolies, peut encore régénérer plus ou moins normalement, montrant que la régénération ne nécessite pas de prolifération cellulaire. L'ectoderme et l'endoderme sont les principaux contributeurs de cellules pour la régénération, dans la mesure où une hydre dépourvue de cellules interstitielles peut encore régénérer.

L'hydre a une polarité globale bien définie qui fait que la structure adéquate est régénérée. Une tête régénère à partir de la face antérieure d'une section cependant qu'un pied se différencie à partir de la face postérieure. Le fondement de cette polarité est révélé par des expériences de greffe. Quand un petit fragment d'hypostome est greffé au niveau de la région gastrique d'une autre hydre, un nouvel axe corporel complet est induit avec tête et tentacules (Figure 2). De manière similaire, la transplantation d'un fragment de la région basale induit la formation d'une nouvelle colonne possédant un disque basal à son extrémité. Ainsi, l'hydre possède une région organisatrice à chacune de ses extrémités, ce qui lui confère sa polarité globale.



Des expériences supplémentaires de greffe ont révélé que l'hypostome est aussi la source d'un facteur dif-

fusible de longue portée inhibant la formation d'une tête, ce qui évite, par inhibition latérale, la formation de têtes supplémentaires (voir Section 1.16). Il est suggéré, de même, que la sole pédieuse produit un inhibiteur pour la formation du pied. Les régions organisatrices aux extrémités corporelles sont donc chacune à l'origine de deux signaux sous forme de deux gradients s'opposant le long de la colonne corporelle : chaque organisateur envoie un signal qui spécifie des valeurs de position et un autre signal gradué qui inhibe la formation soit d'une tête soit d'un pied surnuméraire.

Un modèle simple de la régénération de la tête chez l'hydre est basé sur la paire de gradients de signalisation produite par l'organisateur céphalique. Les deux gradients sont linéaires et leurs valeurs baissent selon un taux constant quand on s'éloigne de la tête (voir Figure 3, graphe 1). Le modèle propose que, chez un animal intact, la régénération de la tête est inhibée, à la condition que pour tous les points le long du corps les niveaux de l'inhibiteur (indiqué par le gradient marqué I) dépassent les seuils définis par la valeur de position (indiqué par le gradient marqué P). Lorsque la tête est enlevée, cependant, la concentration de l'inhibiteur chute au niveau de la surface de coupe (voir Figure 3, graphe 2), et lorsqu'elle tombe en deçà du seuil de la valeur de position à ce site, la valeur de position des cellules situées au niveau de la section augmente jusqu'à celle d'une région céphalique normale (voir Figure 3, graphe 3). Ainsi la première étape clé du processus régénératif est la spécification d'une nouvelle région céphalique au niveau de la section de coupe. La nouvelle tête commence ensuite la production d'un inhibiteur et le gradient inhibiteur est rétabli. Le gradient des valeurs de position retourne également à la normale, mais ceci peut prendre plus de 24 heures.

Des gènes homologues de ceux associés aux organisateurs embryonnaires des vertébrés sont exprimés par l'organisateur céphalique de l'hydre adulte, suggérant une origine évolutive ancienne pour de tels organisateurs. Par exemple, l'homologue de *Wnt3* est exprimé au sommet de l'hypostome chez l'hydre adulte. Dans l'heure qui suit l'ablation de la région céphalique, *Wnt3* est fortement exprimé au niveau de la surface de la coupe (Figure 4). Cette signalisation Wnt locale semble être impliquée dans la mise en place de l'organisateur céphalique et est nécessaire pour que se fasse la régénération, car en son absence, cette dernière ne se réalise pas. De plus, quand la voie de signalisation Wnt est activée dans tout le corps d'une hydre transgénique, de multiples têtes sont générées sur toute la longueur de la colonne corporelle.

L'hydre a aussi montré l'importance de l'apoptose dans la régénération. La découpe d'un fragment d'une hydre dans la mi-région gastrique conduit également à une augmentation de l'expression de *Wnt3* en quelques heures dans les cellules endodermiques de la surface de section régénérant la tête. Cette augmentation est une réponse aux signaux Wnt3 adressés par les cellules interstitielles, qui entrent en apoptose au niveau du site de section. Quand l'apoptose est inhibée, l'expression endodermique de Wnt3 ne se produit pas et la régénération est bloquée. L'apoptose est également nécessaire pour la régénération de la queue chez le têtard, ce qui suggère que des signaux de cellules mourantes puissent être, de manière générale, responsables de l'initiation de la régénération.



Figure 4

Photographies aimablement communiquées par B. Hobmayer and T.W. Holstein, de Hobmayer, et al. : WNT signalling molecules act in axis formation in the dipoblastic metazoan Hydra. Nature 2000, 407 : 186-189.

13.16 La régénération de la patte d'amphibien implique une dédifférenciation cellulaire et une nouvelle croissance

L'amputation d'une patte de triton est suivie d'une migration rapide des cellules épidermiques à partir des bords de la blessure se soldant par le recouvrement

ENCART 13E Régénération des planaires



Figure 1

a. sinhyu - Fotolia.com b. d'après Newmark, P.A., Sánchez-Alvarado, A. : **Regeneration in planaria**. Encyclopedia of Life Sciences. Wiley, 2001.

Les planaires sont des vers plats libres, triploblastiques et dépourvus de cœlome. Elles ont une anatomie complexe et un ensemble d'organes variés avec un système nerveux et des appareils excréteur, reproducteur et digestif. Certaines espèces de planaires sont uniques parmi les bilatériens en ce qu'elles possèdent une population importante de cellules souches adultes qui assurent la régénération de n'importe quelle partie corporelle, y compris le cerveau. La régénération des planaires n'a pas son pareil dans le monde animal. Quand l'une d'entre elles est découpée en de nombreux petits morceaux, chaque fragment régénère en donnant naissance à un nouvel animal complet. Le minimum de taille atteint par un fragment corporel capable de régénérer, est 1/279^e d'un individu adulte, soit 0,3 % de son corps, environ 1 000 cellules.

L'espèce la plus utilisée pour étudier la régénération est la planaire d'eau douce *Schmidtea mediterranea* d'une longueur d'environ 0,1 à 2 cm. Son corps présente une symétrie bilatérale et une polarité antéro-postérieure marquée, avec une région céphalique bien développée et à l'opposé une région caudale. Une polarité dorso-ventrale existe également avec par exemple



Figure 2

D'après Newmark, P.A., Sánchez-Alvarado, A. : Regeneration in planaria. Encyclopedia of Life Sciences. Wiley, 2001.

de sa surface. Cet épiderme de recouvrement (désigné aussi sous le terme de **coiffe apicale épidermique**) est essentiel pour la future régénération, celle-ci ne se produisant pas si les bords du moignon sont ligaturés. La coiffe apicale semble présenter un rôle similaire de celui de la crête apicale ectodermique lors du développement embryonnaire de la patte (voir Section 11.3). Une masse de cellules indifférenciées appelée **blastème** se forme ensuite sous cette coiffe et sera à l'origine du membre régénéré (Fig. 13.25). Les cellules du blastème commencent à se diviser, formant au final un cône allongé. Sur une période de quelques semaines, elles se la présence de deux ocelles sur le côté dorsal céphalique. L'orifice buccal s'ouvre au milieu de la face ventrale et est couplé à un pharynx musculeux qui fait saillie lors de la prise de nourriture. La Figure 1b montre une vue ventrale avec l'intestin (en vert), le pharynx au centre et, partant de l'extrémité céphalique, les cordons nerveux (en rouge).

Les planaires adultes renouvellent constamment leurs tissus. Chez ces dernières, les nouvelles cellules différenciées dérivent d'une population de petites cellules indifférenciées appelées **néoblastes** qui sont les seules cellules chez l'animal adulte à se diviser. Les néoblastes représentent environ 25 à 30 % du nombre total de cellules et sont répartis à travers l'ensemble du corps. En plus de s'auto-renouveler, elles peuvent aussi se différencier en divers types cellulaires : cellules



Figure 3

D'après Reddien. : **Specialized progenitors and regeneration**. Development 2013, **140** : 951-957.

épidermiques, musculaires, germinales et neurones.

La morphallaxie et l'épimorphie (voir Section 13.14) sont impliquées dans la régénération des planaires. La morphallaxie est clairement observée avec le remodelage des fragments corporels qui régénèrent en formant un petit animal complet. Mais des planaires fortement irradiées ne sont pas capables de régénérer, et la régénération de la tête, par exemple, qui suit son amputation, implique l'épimorphie, avec une prolifération et une migration précoce des néoblastes pour former un blastème. Ce blastème ressemble à celui du membre des amphibiens dans la mesure où il consiste en une masse de cellules indifférenciées que recouvre un épithélium au niveau de la blessure. Le blastème céphalique fournit certains éléments nécessaires à la reconstitution de la nouvelle tête, dont le cerveau, qui se forme dans les une à deux semaines suivantes (Figure 2). Les néoblastes sont particulièrement sensibles aux effets des radiations et ceci explique pourquoi des planaires irradiées sont incapables de régénérer.

Une question clé concernant la régénération des planaires est de savoir si les néoblastes sont pluripotents et sont à l'origine de tous les types cellulaires dans le tissu régénéré, ou si la population de néoblastes est hétérogène, avec des cellules ayant individuellement un lignage restreint. Une question du même type s'est posée à propos de la régénération des membres chez les amphibiens concernant la multipotentialité des cellules du blastème (voir Fig. 13.36). Chez les planaires, cette question peut être traitée en transplantant un seul néoblaste dans une planaire adulte irradiée et donc dépourvue de néoblastes, et en suivant la destinée des cellules qui en dérivent. Quelques néoblastes transplantés ont été identifiés comme pluripotents et ont été à

l'origine de populations de néoblastes se différenciant en neurones, cellules intestinales et en cellules d'autres types. Cependant d'autres néoblastes transplantés n'ont pas produit ce type de populations et de ce fait il n'est pas avéré que tous les néoblastes soient des cellules pluripotentes. En effet, durant la régénération des yeux, des néoblastes spécialisés donnent naissance à des cellules pigmentaires tandis que d'autres sont à l'origine de neurones (Figure 3). Cette restriction de lignage des cellules dans un blastème de régénération oculaire, chez les planaires, ressemble à celle des cellules des blastèmes des membres chez les amphibiens.

Le corps des planaires possède une polarité intrinsèque. La polarité antéro-postérieure est maintenue même dans des petits fragments pendant la

régénération, dans la mesure où la face antérieure de la section régénère une tête et que la face postérieure est à l'origine d'une queue. Vers le début du xx^e siècle, il était suggéré que cette polarité soit basée sur des gradients opposés de « matériels céphalique et caudal ». Plus de 100 ans plus tard, un gradient de la signalisation Wnt a été découvert, critique pour le maintien de la polarité antéro-postérieure. Une protéine Wnt (Wnt-P1) est produite par un petit nombre de cellules de la queue chez l'animal adulte, et diffuse antérieurement sous la forme d'un gradient. Tout le long de celui-ci, le signal Wnt réprime la formation d'une tête à l'exception de l'extrémité corporelle antérieure où il est le plus faible. Quand chez une planaire indemne la signalisation Wnt est diminuée par suppression de l'expression de la β -caténine durant une période de temps prolongée, des têtes ectopiques apparaissent partout sur le corps, et chez une planaire en régénération, une tête se développe au lieu d'une queue à partir de la face postérieure de la section, donnant naissance à une planaire à deux têtes. Quand la signalisation Wnt est réduit chez des espèces qui ne régénèrent pas, celles-ci sont alors capables de régénérer une tête complètement fonctionnelle.

Les planaires sont également capables de régénérer une moitié latérale corporelle manquante après une section longitudinale. Cette régénération requiert BMP-4, qui est habituellement présent selon une bande le long de la ligne dorsale médiane. La signalisation BMP est aussi nécessaire pour le rétablissement de l'axe dorso-ventral durant la régénération. Au final, la remarquable capacité de régénération des planaires adultes semble dépendre de l'utilisation de signaux qui normalement maintiennent l'homéostasie tissulaire.

différencient pour former cartilages, muscles et tissu conjonctif. Les cellules indifférenciées du blastème ont, à un stade précoce, une origine locale et dérivent des tissus différenciés du moignon, près du site d'amputation. Elles sont issues en particulier du derme, mais aussi de cartilages et de muscles. Fig. 13.25 Régénération de la patte antérieure du triton *Notophthalmus viridescens*. La partie gauche montre la régénération de la patte après amputation distale à mi-radius/ulna. La partie droite montre la régénération après amputation proximale à mi-humérus. En haut du document, les membres sont montrés avant leur amputation. Après l'amputation, des clichés successifs sont effectués aux temps indiqués. À noter que le blastème donne naissance à des structures distales par rapport au niveau de coupe (Barre d'échelle = 1 mm).



La capacité qu'ont des cellules musculaires squelettiques du triton à se dédifférencier et à retourner à un état prolifératif au niveau du blastème est particulièrement intrigante car normalement, chez les vertébrés, ce type de cellules ne se divise plus une fois différenciées. Un trait caractéristique de la différenciation musculaire est l'arrêt du cycle cellulaire après que la fusion des myoblastes en myotubes a eu lieu (voir Section 8.5). Cet arrêt implique la déphosphorylation de la protéine du rétinoblastome RB qui contrôle le cycle cellulaire (voir Section 13.5). *In vitro*, des cellules musculaires de souris dépourvues de RB peuvent se diviser de nouveau, et au cours de la régénération de la patte de triton, une phosphorylation inactive cette protéine, rendant ainsi possible la reprise des divisions. Par la suite, les myotubes se fragmentent pour former des cellules mononucléées qui se divisent. Le retour à une prolifération est aussi associé à l'activation de la thrombine dans le blastème. En effet, la thrombine pourrait être un facteur clé de la régénération dans plusieurs systèmes, notamment la régénération du cristallin du triton à partir de la bordure dorsale de l'iris qui se trouve également corrélée à une activité thrombine dans cette région.

La thrombine est une enzyme protéolytique dont le rôle est bien connu dans les processus de coagulation, et semble aussi être impliquée dans la production d'un environnement favorable à des phénomènes de dédifférenciation. *In vitro*, des cellules musculaires multinucléées post-mitotiques de triton peuvent rentrer en cycle cellulaire en présence de thrombine. La dédifférenciation des cellules musculaires implique



aussi la production du facteur de transcription à homéodomaine Msx1. Ce facteur multifonctionnel est connu pour empêcher la différenciation myogénique des cellules de mammifères (voir Section 8.6) et sa présence caractérise les cellules mésenchymateuses indifférenciées capables d'intervenir dans la régénération. Des cellules qui expriment *Pax7*, fonctionnellement similaires aux cellules satellites à l'origine de la régénération des fibres musculaires chez les mammifères adultes (voir Section 8.13), ont également été identifiées chez des tritons adultes et des axolotls.

Une des questions clés de la régénération des membres est de savoir si les cellules du blastème sont multipotentes ou si elles présentent un lignage restreint (Fig. 13.6). Est-ce que les cellules du blastème ayant une origine musculaire, par exemple, seront à l'origine de n'importe quel type de cellules différenciées dans le membre régénéré ? En d'autres termes peuvent-elles se transdifférencier (voir Section 8.17) ou ne seront-elles capables de donner que des cellules musculaires ?

D'anciens travaux suggéraient que les cellules des blastèmes chez les amphibiens sont multipotentes, mais des travaux plus récents concernant la régénération des pattes chez l'axolotl *Ambystoma mexicanum* ont révélé que les cellules du blastème étaient en fait à lignage restreint. Il a été montré expérimentalement que les cellules du blastème ne retournent pas à un état multipotent, mais conservent un potentiel limité de différenciation lié à leur origine. Le devenir individuel de divers types tissulaires dans un membre en régénération a été suivi en transplantant des tissus issus d'un axolotl transgénique exprimant la GFP (pour *Green Fluorescent Protein*). Après la transplantation d'un échantillon de tissu d'un type donné, tel que musculaire ou épidermique, dans la patte antérieure de jeunes individus non transgéniques de la même espèce, une amputation est pratiquée au niveau du site de transplantation et le devenir des cellules transplantées marquées est ensuite suivi pendant toute la durée du processus de régénération (Fig. 13.27). L'utilisation de marqueurs tissu-spécifiques rend ensuite possible l'identification du type de tissu constitué par les cellules fluorescentes.

Ces expériences ont montré que les cellules du blastème issues d'un muscle, une fois transplantées, ne donnaient que des cellules musculaires (Fig. 13.28). Des expériences supplémentaires de suivi des lignages cellulaires ont montré que les muscles régénérés des pattes d'axolotl dérivent de cellules satellites résidentes exprimant *Pax7*, alors que pour les pattes de triton, les muscles formés proviennent de la dédifférenciation de cellules musculaires. Les cellules cartilagineuses et épidermiques ont une destinée également restreinte tout comme les cellules gliales de Schwann à l'origine du revêtement de myéline des fibres nerveuses périphériques.

Une exception est constituée par les cellules du derme qui participent à la fois à la mise en place d'un nouveau derme et d'un nouveau squelette cartilagineux. Il a été montré que les cellules cartilagineuses issues des cellules du blastème gardent en « mémoire » leur identité de position d'origine le long de l'axe proximo-distal du membre. Ainsi, après transplantation, des cellules cartilagineuses issues d'une région proximale du membre donneur sont à l'origine de structures distales dans le membre en régénération, alors que des cellules du même type, issues d'une région distale ne produisent pas de structures proximales. En revanche, les cellules musculaires ne

Fig. 13.26 Les cellules du blastème sont-elles multipotentes ou à lignage restreint ? Des cellules multipotentes du blastème issues de tissus différenciés seraient capables de donner tous les tissus du membre, cartilage, muscle et derme, par exemple. Des cellules du blastème à lignage restreint ne seraient en revanche capables que de former des tissus conformes à leur origine.



Fig. 13.27 Les cellules participant à la régénération d'un membre d'axolotl ont un potentiel restreint de développement. La méthode expérimentale est rapportée dans les schémas du haut et les photographies en dessous montrent un membre à différents temps de sa régénération. Des cellules d'un type particulier de tissu (ici le derme) et d'un site donné (ici proximal) d'une patte d'un jeune axolotl transgénique pour la GFP, sont transplantées dans un membre d'un animal non transgénique qui subit une amputation au niveau de la greffe. Dans la patte en régénération qui croît à partir du blastème, les cellules transplantées et leurs descendantes peuvent être détectées par leur fluorescence verte et le type tissulaire qu'elles forment

Avant Membre Régénération amputation régénéré derme derme cartilage cartilage muscle muscle cellules de cellules de Schwann Schwann épiderme épiderme

Fig. 13.28 Restriction du lignage cellulaire dans le blastème d'axolotl. Les cellules d'un blastème issues d'un type particulier de tissu sont en général à lignage restreint et forment seulement le tissu du même type dans un membre régénéré. Les cellules de blastème issues du derme contribuent à la fois à la formation du derme et du cartilage et celles d'origine cartilagineuse participent de manière réduite à la formation du derme.

identifié. Dans le cas illustré, les cellules dermiques transplantées seront à l'origine d'un nouveau tissu dermique et du squelette cartilagineux, mais non de muscles. La Figure 13.28 montre les restrictions de lignage observées. Les cellules provenant d'une région proximale du membre pourront former des structures distales, comme c'est le cas ici avec la présence de cellules marquées dans les doigts, mais des cellules cartilagineuses transplantées ne formeront pas de structures plus proximales.

D'après Kragl, M., et al. : **Cells keep a memory of their tissue origin during axoloti limb regeneration**. Nature, 2009, **460** : 60-65.

semblent pas posséder une quelconque identité de position, ce qui suggère qu'au cours du développement du membre (voir Section 11.15), les tissus conjonctifs guident la mise en place du patron musculaire.

Il a été récemment montré que les macrophages sont nécessaires pour la régénération des pattes chez les axolotls adultes et ceci est peut-être lié à une réponse faite à la lésion déclenchant le début de la régénération. Il est bien connu que les macrophages sont recrutés au niveau des blessures chez les mammifères, et que cela conduit à une cicatrisation. Il est toutefois surprenant de constater que dans les 24 h qui suivent l'amputation, les macrophages sont présents au niveau de l'épithélium lésé. De plus, l'élimination totale des macrophages d'un axolotl quelques jours avant une amputation provoque le blocage complet de la régénération, les moignons pouvant néanmoins régénérer quand l'animal subit une ré-amputation et que la population de macrophages s'est reconstituée. L'expression normale de plusieurs gènes, dont celle de *Msx1*, dans un blastème précoce est réduite en absence de macrophages, suggérant que ces derniers peuvent être impliqués dans la promotion de la dédifférenciation.

13.17 La régénération des pattes chez les amphibiens dépend de la présence de nerfs

La croissance et le développement d'un blastème de régénération d'une patte d'amphibien ne dépendent pas seulement de l'épiderme recouvrant la blessure (la coiffe apicale), mais aussi de son innervation (Fig. 13.29). Dans les pattes d'amphibien où les nerfs ont été coupés avant l'amputation, un blastème se forme mais ne grossit pas. Les nerfs n'ont pas d'influence sur le caractère ou le patron de la structure régénérée, c'est l'importance de l'innervation, et non le type de nerf, qui importe. Dans les pattes en régénération de triton adulte, un facteur de croissance essentiel nAG (pour *newt Anterior Gradient protein*) est sécrété initialement par les cellules de Schwann des nerfs présents et plus tardivement par les cellules glandulaires de l'épiderme de la blessure. Le traitement du blastème d'une patte dé-innervée avec du nAG est suffisant pour permettre la régénération complète de la patte.

Il est intéressant de constater que si des pattes d'embryon de triton sont dé-innervées très précocement lors de leur développement, les soustrayant ainsi de



l'influence nerveuse, ces pattes peuvent quand même régénérer malgré l'absence totale d'innervation (voir Fig. 13.29, à droite). Si une patte dé-innervée est par la suite innervée, celle-ci devient rapidement dépendante de l'innervation pour régénérer. Ceci suggère que la dépendance à l'innervation ne s'impose à la patte qu'après que les nerfs se sont développés dans cette dernière. Il est maintenant établi que ces phénomènes peuvent être attribués aux taux de nAG présent. Au cours du développement normal d'une patte, *nAG* est très fortement exprimé dans l'épiderme, mais son expression se réduit durant l'innervation, et reste à un niveau bas chez l'adulte. Après dé-innervation des pattes, cette réduction d'expression ne se produit pas et des taux élevés de nAG persistent chez l'adulte, expliquant ainsi pourquoi ces pattes peuvent régénérer même si elles ne sont pas innervées. Quand une patte est secondairement ré-innervée, la production de nAG est régulée négativement dans l'épiderme et la patte devient dépendante des nerfs pour sa régénération.

Un exemple spectaculaire de l'influence des nerfs sur la régénération des pattes d'amphibiens est illustré par le fait que si un nerf principal périphérique, tel que le nerf sciatique, est coupé et inséré soit dans une blessure faite à une patte soit au niveau du flanc de l'animal, une patte surnuméraire se développe à l'endroit de l'insertion. Ce système expérimental apporte la possibilité d'étudier la régénération des membres sans avoir à causer d'importants dommages cellulaires dus à une amputation.

13.18 Le blastème donne naissance à des structures ayant des valeurs de position distales par rapport au site d'amputation

La régénération s'effectue toujours selon une direction distale par rapport à la zone de la section, ce qui permet ainsi le remplacement des parties perdues. Si la main est coupée à la hauteur du poignet, seuls les carpes et les doigts sont régénérés alors que si l'amputation se situe au milieu de l'humérus, toutes les parties distales par rapport au site de section, dont celle de l'humérus, sont régénérées. La valeur de position le long de l'axe proximo-distal est de ce fait d'une grande importance et elle est au moins partiellement retenue dans le blastème. Celui-ci possède une autonomie morphogénétique considérable. S'il est transplanté dans une position neutre qui permet sa croissance, telle que la crête dorsale d'une larve de triton ou même dans la chambre antérieure d'un œil, ce blastème donnera naissance à une structure régénérée correspondant au site de son prélèvement.

La croissance du blastème et la nature des structures qu'il développe dépend du lieu d'amputation et non de la nature des tissus les plus proximaux. La patte ne « cherche » pas simplement à essayer de remplacer ses parties manquantes. Ceci a été montré dans une expérience classique dans laquelle l'extrémité distale d'une patte de triton, amputée au niveau du poignet, est implantée dans le flanc du même animal de manière à assurer l'irrigation de l'implant. La patte amputée est ensuite section-née à la hauteur du mi-humérus. Les deux zones de section régénèrent des parties

Fig. 13.29 Innervation et régénération des membres. Des membres normaux nécessitent une innervation pour régénérer (à gauche). Les membres dé-innervés avant amputation ne régénéreront pas (centre à gauche). Cependant, si le membre est amputé et que la surface d'ablation subit une électroporation avec un plasmide codant la protein nAG de triton, une régénération est restaurée (centre à droite). Les membres qui n'ont jamais été innervés, suite à une dé-innervation lors du développement, peuvent régénérer normalement en absence d'innervation (à droite).



Fig. 13.30 La régénération des membres s'effectue toujours selon une direction distale. L'extrémité distale d'une patte est amputée et le membre est inséré dans le flanc de l'animal. Une fois qu'une vascularisation s'est établie, une section est faite au niveau de l'humérus. Les deux surfaces des sections régénèrent les mêmes structures distales, alors même que dans un des cas, des structures distales sont déjà présentes.



distales, même si l'implant situé dans le flanc possède déjà un radius et un cubitus (Fig. 13.30).

Le blastème est beaucoup plus grand que le bourgeon d'un membre embryonnaire en ayant un nombre de cellules pouvant être dix fois plus important. Cette taille rend peu probable que des signaux puissent bien diffuser au sein du blastème. En fait, la régénération peut être mieux comprise à partir d'un membre adulte ayant une série de valeurs de position le long de l'axe proximo-distal mise en place durant le développement embryonnaire (voir Section 11.6). Le membre en régénération « lit » en quelque sorte la valeur de position au site d'ablation et ensuite restitue toutes les valeurs de position qui lui sont distales. La capacité des cellules à reconnaître une discontinuité dans la série des valeurs de position est illustrée en greffant un blastème distal sur un moignon proximal. Dans ce cas, le moignon du membre antérieur et le blastème possèdent des valeurs de position différentes correspondant, respectivement, à l'épaule et au poignet. Le résultat est la formation d'une patte normale dont les structures entre l'épaule et le poignet ont été générées par **croissance intercalaire**, surtout à partir du moignon proximal alors que les cellules provenant du poignet donnent essentiellement les structures de la main (Fig. 13.31).

Une question fondamentale est de savoir comment l'information de position est codée au niveau moléculaire. Une avancée majeure à ce propos été l'identification de Prod1, une protéine à la surface des cellules et qui est présente selon un gradient le long de l'axe proximo-distal de la patte de triton, avec l'expression la plus forte au niveau proximal. Les valeurs proximo-distales dans le blastème peuvent être altérées par un traitement à l'acide rétinoïque, comme cela est évoqué plus en détail dans le paragraphe suivant, et ce traitement a été utilisé pour comparer l'expression du gène *Prod1* dans les blastèmes dont les valeurs proximo-distales ont été modifiées. Le traitement à l'acide rétinoïque provoque une augmentation de son expression et celle-ci est plus élevée dans les blastèmes « proximaux » que dans les blastèmes « distaux ». Prod1 pourrait de ce fait coder des valeurs de position. Le facteur de croissance nAG, essentiel pour la régénération d'une patte (voir Section 13.17), est un ligand de Prod1. L'idée est que nAG n'a pas d'influence directe dans l'initiation du patron proximo-distal, mais agit par le biais de Prod1 pour promouvoir la division cellulaire.

L'existence d'un gradient de Prod1 concorde bien avec l'observation que des propriétés de surface des cellules sont impliquées dans la régénération. Quand des mésenchymes de deux blastèmes issus de sites proximo-distaux différents sont mis en présence en culture, le plus proximal enrobe le distal (Fig. 13.32, vignette gauche) alors que des mésenchymes provenant de deux blastèmes issus de sites similaires se maintiennent dans des limites stables. Ce comportement suggère qu'il existe une gradation de l'adhérence cellulaire le long de l'axe proximo-distal, celle-ci étant la plus forte distalement. Un comportement semblable de recouvrement s'observe lors de mélanges d'explants d'ectoderme, de mésoderme et d'endoderme présomptifs issus d'embryons d'amphibiens chez lesquels les tissus se côtoient normalement et adhèrent différentiellement les uns aux autres (voir Section 9). En ce qui concerne les explants de blastème,

Fig. 13.31 Intercalation proximo-distale dans un membre en régénération. Une greffe d'un blastème distal sur un moignon proximal conduit à l'intercalation de toutes les structures proximales jusqu'au blastème distal. Presque tous les tissus intercalés proviennent du bourgeon proximal.

Fig. 13.32 Les propriétés de surface des cellules varient le long de l'axe proximo-distal. À gauche : quand des mésenchymes issus de blastèmes distaux et proximaux sont mis en contact en culture, le mésenchyme proximal englobe le distal qui présente une plus forte adhérence intercellulaire que lui. Au centre : si un anticorps anti-Prod1 est ajouté dans le milieu de culture des blastèmes, le tissu proximal n'entoure pas le distal. À droite : si un blastème distal (ici au niveau d'une section de poignet) est greffé sur la surface dorsale d'un blastème plus proximal, le blastème de régénération du poignet se déplacera distalement sur le membre receveur jusqu'à la position qu'il occupait originellement et régénère une main.

les cellules des explants distaux restent plus fortement attachées les unes aux autres que celles issues d'un blastème proximal et qui donc s'étalent de manière plus importante. Prod1 est impliquée dans ce processus car l'ajout d'un anticorps dirigé contre elle dans le milieu de culture, inhibe l'étalement de l'explant proximal sur le distal.

Une différence d'adhérence des tissus le long de l'axe proximo-distal est également suggérée par le comportement des blastèmes distaux quand ils sont greffés sur la face dorsale d'un blastème proximal, de telle sorte que leurs cellules mésenchymateuses soient en contact. Dans ces conditions, lors de la régénération de la patte, le blastème distal se déplace jusqu'au site dont il est originaire (voir Fig. 13.32, vignettes de droite). Ceci suggère que ses cellules adhèrent plus fortement dans la région du poignet régénéré que dans la région proximale où s'est effectuée la greffe. Quand un blastème formé au niveau d'une épaule est greffé sur un moignon d'épaule, il ne se déplace pas et une croissance normale distale s'observe à partir de ce dernier.

Toutes ces expériences suggèrent que les valeurs de position proximo-distales au cours de la régénération des pattes d'amphibiens urodèles, sont codées selon un gradient, probablement en partie au niveau des surfaces cellulaires, et que le comportement des cellules entre elles – croissance, mouvement et adhérence - permettant une spécification axiale, est fonction de l'expression de ce gradient.

Le maintien de la continuité des valeurs de position par intercalation est une propriété fondamentale des systèmes de régénération par épimorphose, et qui se retrouvera illustré à propos de la patte de blatte. Il est difficile d'apprécier si toutes les cellules d'un blastème héritent d'une valeur de position particulière à partir de leurs précurseurs différenciés, et dans quelle mesure elles sont soumises à des signaux induisant l'expression adéquate de leur valeur de position. Dans l'expérience sur l'axolotl schématisée dans la Figure 13.27, les cellules cartilagineuses conservent leur identité de position originale alors que ce n'est pas le cas des cellules musculaires. Une régénération normale s'effectuant à partir d'un blastème peut être considérée comme le résultat d'une intercalation entre cellules au niveau de l'amputation et celles ayant les valeurs de position les plus distales, comme étant spécifiées par l'épiderme de la blessure. Mais si une intercalation a été au départ invoquée, il a été maintenant démontré que les cellules d'un blastème de régénération sont spécifiées selon une direction proximo-distale, comme lors du développement des membres (voir Chapitre 11).

13.19 L'acide rétinoïque peut modifier les valeurs de position proximodistales dans des membres en cours de régénération

Dans le Chapitre 11, a été vu comment un traitement à l'acide rétinoïque peut altérer les valeurs de position au cours du développement de la patte d'un poulet (voir Section 11.8). Il a aussi des effets saisissants sur les membres des amphibiens en cours de régénération.

Quand un tel membre est exposé à de l'acide rétinoïque, les blastèmes se « proximalisent », c'est à dire que le membre se régénère comme si il avait été amputé au départ en un site plus proximal. Par exemple, le traitement à l'acide rétinoïque d'un membre amputé au niveau du poignet donne lieu non seulement à la régénération d'éléments distaux par rapport au site d'amputation, mais encore à la formation de radius, cubitus et humérus complets surnuméraires (Fig. 13.33). L'effet de l'acide rétinoïque est dose-dépendant et avec une forte dose, pour un membre amputé au niveau de la main, il est possible qu'un membre surnuméraire complet régénère, incluant une partie de la ceinture pectorale. L'acide rétinoïque altère donc la valeur de position proximo-distale du blastème, rendant celui-ci plus proximal. Il agit probablement en modifiant diverses voies permettant la spécification de l'information de position, en particulier en augmentant l'expression de *Prod1* (voir Section 13.18), dans la mesure où sa surexpression dans les cellules d'un blastème distal provoque leur transformation en cellules



Fig. 13.33 L'acide rétinoïque peut

« proximaliser » les valeurs de position. Une patte antérieure amputée au niveau de la main, comme cela est indiqué par la ligne pointillée, puis traitée à l'acide rétinoïque, régénère des structures qui auraient dû normalement se développer à la suite d'une amputation au niveau de l'extrémité proximale de l'humérus. Barre d'échelle = 1 mm.

Photographie aimablement communiquée par M. Maden.

Fig. 13.34 L'acide rétinoïque

« proximalise » la valeur de position des cellules individuelles. Quelques cellules d'un blastème distal de triton sont transfectées avec un récepteur chimérique qui active la voie du récepteur de l'acide rétinoïque, mais qui peut être activé par la thyroxine. Ce blastème est greffé au niveau d'un moignon proximal et traité à la thyroxine. Pendant la croissance intercalaire, les cellules transfectées, qui ont été marquées, migrent proximalement car leurs valeurs de position ont été "proximalisées" par l'activation fonctionnelle du récepteur de l'acide rétinoïque. Les photographies illustrent la "proximalisation" des cellules transfectées. Barre d'échelle = 0,5 mm.

Photographies reproduites avec l'autorisation de Pecorino, L.T., et al. : Activation of single retinoic acid receptor isoform mediates proximodistal respecification. Curr. Biol. 1996, 6 : 563-569. Copyright Elsevier.



plus proximales. L'acide rétinoïque paraît aussi décaler proximalement les valeurs de position en activant des gènes à homéoboîte *Meis* impliqués dans la spécification des valeurs de position proximales dans un membre en développement, et dont l'expression est normalement réprimée dans les régions distales. L'acide rétinoïque peut également, sous certaines conditions expérimentales, dévier postérieurement les valeurs de position le long de l'axe antéro-postérieur et provoquer une duplication des doigts.

L'acide rétinoïque peut agir par le biais de plusieurs récepteurs nucléaires différents, mais seul RAR∂2 est impliqué dans les changements de valeur de position proximo-distale dans le membre en régénération. En construisant un récepteur chimérique à partir de séquences issues d'un site de liaison à l'ADN de RAR∂2 et du récepteur de la thyroxine, le récepteur à l'acide rétinoïque peut être sélectivement activé par la thyroxine et les effets de son activation être étudiés expérimentalement (Fig. 13.34). Dans un premier temps, les cellules d'un blastème distal sont transfectées avec le gène codant le récepteur chimérique, puis greffées dans un bourgeon proximal et traitées par de la thyroxine. Un mouvement des cellules transfectées s'observe vers des régions plus proximales dans le blastème de régénération, ce qui montre que l'activation de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque peut « proximaliser » les valeurs de position des cellules, celles-ci répondant ensuite en se déplaçant vers des sites plus proximaux. Prod1 est un très sérieux candidat pour intervenir dans ce changement dans la mesure où il peut entraîner le mouvement des cellules vers la région proximale quand sa concentration est augmentée.

Un autre effet remarquable de l'acide rétinoïque est sa capacité à provoquer une transformation homéotique des queues en membres chez les têtards de *Rana temporaria*. Si la queue des têtards est supprimée, celle-ci régénère. Mais le traitement des queues en régénération avec de l'acide rétinoïque au moment où les pattes postérieures se développent, conduit à ce que des membres surnuméraires apparaissent à la place d'une queue régénérée (Fig. 13.35). Il n'y a pas encore une explication satisfaisante rendant compte de ce résultat, mais l'acide rétinoïque pourrait modifier la valeur de position





antéro-postérieure du blastème de régénération de la queue en lui donnant celle du site, le long de l'axe antéro-postérieur, où les membres postérieurs se développent.

13.20 Les mammifères peuvent régénérer leurs extrémités digitales

Bien que les mammifères ne puissent pas régénérer la totalité de leurs membres, beaucoup d'entre eux, dont les jeunes enfants, peuvent régénérer l'extrémité de leurs doigts, à condition que la zone tissulaire dermique génératrice de l'ongle, la matrice de l'ongle, soit encore présente. Chez les souris et les enfants, la zone à partir de laquelle les doigts sont capables de régénérer est respectivement limitée à la base de la griffe ou de l'ongle. Ceci reflète probablement la présence, sous la matrice de l'ongle, de cellules de tissu conjonctif produisant le facteur de transcription Msx1 qui régule l'expression de *Bmp4*, et qui est associé à des cellules mésenchymateuses indifférenciées, comme cela a été évoqué précédemment. Au cours du développement des membres de mammifères, *Msx1* est exprimé à l'extrémité du bourgeon embryonnaire du membre, et chez la souris, il continue d'être exprimé à l'extrémité des doigts même après la naissance, région dans laquelle une régénération des doigts peut se réaliser.

Comme dans la régénération des membres chez les amphibiens, les cellules qui prolifèrent pour régénérer l'extrémité d'un doigt chez la souris, semblent être à lignage restreint. Par exemple, dans des souris transgéniques chez lesquelles les cellules exprimant *Sox9* produisent également la GFP, celle-ci servant de traceur des précurseurs des cellules squelettiques, seules les cellules osseuses du squelette des extrémités des doigts régénérés présentent de la GFP, alors que les cellules des autres tissus tels que les tendons ou le derme ne la contiennent pas. La voie de signalisation Wnt est activée durant la régénération de l'extrémité des doigts et promeut la croissance des nerfs indispensables à la régénération. La signification de la capacité des extrémités des doigts des mammifères à régénérer demeure obscure. Il est important de considérer comment la capacité à régénérer des appendices a pu évoluer parce que cela pourrait nous aider à comprendre pourquoi nous ne pouvons pas régénérer nos propres membres (Encart 13F).

13.21 Les pattes des insectes intercalent des valeurs de position à la fois par des croissances proximo-distale et circonférentielle

Les membres de quelques insectes, tels la blatte ou le criquet, peuvent régénérer. A la différence de la drosophile, ces insectes n'ont pas de métamorphose complète et les stades juvéniles sont très similaires à des adultes en miniature. Quand le tibia d'un jeune au troisième stade larvaire du grillon *Gryllus bimaculatus* est amputé, une patte adulte est reconstituée en 40 jours environ. Les signalisations Wingless et Decapentaplegic activent la voie de signalisation de EGFR (pour *Epidermal Growth Factor Receptor*) selon un gradient proximo-distal dans le blastème du grillon, qui configure la régénération distale de la patte.

Chez la drosophile, comme cela a été évoqué précédemment dans le chapitre, une signalisation *via* les cadhérines Fat et Dachsous et la voie Hippo coordonne la **Fig. 13.35** L'acide rétinoïque peut induire la formation de membres surnuméraires au niveau d'une queue en régénération d'un têtard de grenouille. Après amputation, le bourgeon d'une queue en régénération d'un têtard de *Rana temporaria* est traité avec de l'acide rétinoïque au moment où les pattes postérieures se développent. Le traitement provoque l'apparition de pattes postérieures surnuméraires à la place d'une nouvelle queue. Barre d'échelle = 5 mm.

Photographie aimablement communiquée par M. Maden. prolifération cellulaire et l'apoptose dans les disques imaginaux, déterminant leur taille finale et ainsi celle des ailes et des pattes adultes (voir Section 13.4). Des expériences utilisant la technique de l'interférence à ARN pour étudier le rôle de Fat, Dachsous et la voie Hippo dans la régénération de la patte du grillon suggèrent que c'est également le cas chez un insecte dont les pattes se développent directement. L'inactivation de *Fat* ou de *Dachsous* conduit à une patte régénérée plus courte que la normale, cependant que l'inactivation des gènes de la voie Hippo provoque la formation d'une patte plus longue. Il est proposé qu'un gradient Fat/Dachsous existe le long de la patte et que la rupture de celui-ci pourrait contrôler la prolifération cellulaire.

La régénération des pattes d'insectes se réalise selon un processus d'épimorphose avec la formation d'un blastème et une croissance qui intercale des valeurs de position manquantes. Ceci diffère du point de vue habituel selon lequel l'axe proximo-distal de la patte d'amphibien en régénération est spécifié (Section 13.18). Cependant, en ce qui concerne les pattes d'amphibien quand des cellules ayant des valeurs de position différentes sont placées les unes à côté des autres, une croissance intercalaire se produit de manière à régénérer les valeurs de position manquantes. Une telle intercalation des valeurs de position semble être une propriété générale des systèmes de régénération par épimorphisme et ceci est particulièrement visible avec la régénération des pattes chez la blatte. Ceci s'observe également chez la drosophile lors de la régénération des disques imaginaux d'aile et de patte après amputation.

Une patte de blatte possède un nombre de parties distinctes, avec dans l'ordre le long de l'axe proximo-distal, la coxa, le fémur, le tibia et le tarse. Chaque segment semble contenir un lot similaire de valeurs de position proximo-distales et circonférentielles et intercalera celles manquantes lors d'une nouvelle croissance. Quand un tibia amputé distalement est greffé sur un tibia hôte sectionné à un niveau plus proximal, une croissance locale s'observe à la jonction entre la greffe et la partie de l'hôte et les zones centrales manquantes du tibia sont intercalées (Fig. 13.36, vignettes de gauche). Contrairement à la régénération des amphibiens, il y a une contribution prédominante de la partie distale. Comme chez les amphibiens, la régénération est un phénomène local et les cellules sont indifférentes à l'organisation globale du tibia. Ainsi, quand un tibia amputé



Fig. 13.36 Intercalation des valeurs de position par croissance dans une patte de blatte en régénération. À gauche : quand un tibia amputé distalement (5) est greffé sur un tibia hôte amputé proximalement (1), une intercalation des valeurs de position 2-4 se produit, quelle que soit l'orientation proximo-distale des greffons, et un tibia normal est régénéré. À droite : quand un tibia amputé proximalement (1) est greffé sur un tibia hôte amputé distalement (4), alors le tibia régénéré est plus long que la normale et la partie régénérée présente une orientation inverse de celle de la normale, à en juger par l'orientation des soies superficielles. Cette inversion de l'orientation de la régénération est due au renversement du gradient des valeurs de position. Le gradient de l'information de position proposé est montré sous chaque figure.

Illustration d'après French, V., et al. : **Pattern** regulation in epimorphic fields. Science 1976, **193** : 969-981.



proximalement est greffé en un site plus distal, ce qui forme alors un tibia anormalement long, une intercalation restaure les valeurs de position manquantes et est à l'origine d'un tibia encore plus long (Fig. 13.36, à droite). La partie régénérée présente une orientation inverse de celle du restant de la patte, comme l'indique l'orientation des soies, ce qui suggère que le gradient des valeurs de position spécifie également la polarité cellulaire, comme dans les segments du corps de l'insecte (voir Chapitre 2). Ces résultats montrent que lorsque des cellules n'ayant pas des valeurs de position qui se suivent sont placées de nouveau les unes à côté des autres, une croissance survient et intercale les valeurs manquantes permettant d'établir une suite continue des valeurs de position.

Un ensemble similaire de valeurs de position est présent au niveau de chaque segment de la patte. Ainsi, quand un tibia amputé de moitié est greffé sur un fémur-hôte sectionné à mi-hauteur, une cicatrisation se réalise sans intercalation. En revanche, un fémur amputé distalement greffé sur un tibia-hôte amputé proximalement, conduit à une intercalation majoritairement de type fémoral. D'autres facteurs doivent exister différenciant chaque segment, comme pour les segments de la larve de l'insecte.

Une régénération intercalaire peut également se produire selon une direction circonférentielle. Quand une bande longitudinale d'épiderme est prélevée d'une patte de blatte, des cellules normalement non voisines entrent en contact entre elles, et une intercalation selon une direction circonférentielle va se réaliser après la mue (Fig. 13.37). Des divisions cellulaires se produisent préférentiellement au niveau des sites de rupture sur le pourtour de la circonférence. On peut attribuer des valeurs de position le long de la circonférence selon le sens d'une aiguille d'une montre avec des valeurs allant de manière continue de 1 à 12. Comme pour l'axe proximo-distal, il se produit une intercalation des valeurs de position absentes.

13.22 La régénération du cœur du poisson-zèbre implique la reprise des divisions des cardiomyocytes

Quelques vertébrés ont la capacité de régénérer le cœur. Par exemple, si le ventricule cardiaque d'un poisson-zèbre adulte subit une ablation de 20 %, celui-ci va croître de nouveau et le tissu régénéré s'intégrera fonctionnellement avec le tissu cardiaque existant (Fig. 13.38). Ce phénomène également observé chez les tritons, est particuliè-rement intéressant chez le poisson-zèbre, dans la mesure où la régénération peut être étudiée génétiquement chez cet organisme modèle.

Une des questions clés de la régénération cardiaque chez le poisson-zèbre est l'origine des cellules qui produisent le tissu régénéré. La cartographie génétique des lignages montre que les cellules musculaires myocardiques matures adultes, les **cardiomyocytes**, et pas des cellules progénitrices indifférenciées, constituent la principale source des cellules proliférantes pour la régénération. Le taux de prolifération des cardiomyocytes est très faible chez le poisson-zèbre adulte, mais après le prélèvement de l'extrémité du ventricule cardiaque, les cardiomyocytes au niveau et autour de la zone ventriculaire lésée se dédifférencient et commencent à se diviser. Les nouveaux cardiomyocytes migrent ensuite dans la zone de la blessure et dans le même temps, le tissu régénéré se

Fig. 13.37 Intercalation circonférentielle dans la patte de blatte. La patte est vue en section transversale. Quand une partie de l'épiderme ventral de la blatte est prélevée (à gauche), les bords de la coupure cicatrisent simultanément (au centre). Quand l'insecte mue et qu'une nouvelle cuticule se met en place, les valeurs de position circonférentielles sont intercalées (à droite). Les valeurs de position sont disposées autour de la circonférence de la patte, selon le sens des aiguilles d'une montre.

Illustration d'après French, V., et al. : Pattern regulation in epimorphic fields. Science 1976, **193** : 969-981. Fig. 13.38 Étapes de la régénération cardiaque chez le poisson zèbre adulte après ablation de l'extrémité ventriculaire. Une activation de l'endocarde se manifeste partout dans le cœur quelques heures après l'amputation, l'activation de l'épicarde se produisant quelques jours plus tard et se caractérisant par l'expression du gène codant l'enzyme de la voie de synthèse de l'acide rétinoïque, raldh2, et de gènes impliqués dans d'autres voies de signalisation. Sept jours après l'amputation, l'activation de l'épicarde est circonscrite au niveau de la zone blessée. Les séquences régulatrices contrôlant l'expression de gata4, un facteur de transcription impliqué dans le développement cardiaque et sa croissance, sont activées dans les cardiomyocytes. Le muscle en régénération est vascularisé au cours des sept jours suivants. Vers 30 jours, le myocarde est régénéré et est couplé électriquement avec le reste du cœur.

D'après la Figure 1 de Gemberling M., et al. : **The zebrafish as a model for complex regeneration**. Trends genet. 2013, **29** : 611-620.



vascularise. Le nouveau tissu myocardique se couple électriquement aux cardiomyocytes de la région cardiaque non endommagée, 2 à 4 semaines après la lésion.

Cependant, dans un modèle embryonnaire de régénération cardiaque chez le poisson-zèbre, la lésion musculaire ventriculaire peut aussi être réparée par transdifférenciation des cellules des oreillettes, dites aussi auriculaires. Suite à la lésion ventriculaire, les cellules auriculaires situées à la lisière de l'oreillette et du ventricule se dédifférencient et commencent à se diviser avant de migrer vers la région lésée où elles se différencient en cellules musculaires ventriculaires.

La régénération du myocarde chez le poisson-zèbre adulte implique des interactions avec les cellules des autres enveloppes cardiaques, l'endocarde et l'épicarde (voir Section 11.32). Dès l'heure suivant la lésion, la totalité de l'endocarde, l'endothélium qui tapisse les cavités cardiaques, commence à exprimer raldh2 qui code une enzyme nécessaire à la synthèse de l'acide rétinoïque (voir Fig. 13.38). Dans les un ou deux jours suivants, raldh2 s'exprime également dans l'ensemble de l'épicarde, la fine couche externe qui recouvre le myocarde, puis plus tard son expression se confine au niveau de la zone lésée. Les cellules épicardiques prolifèrent et entourent le muscle en régénération, libérant de l'acide rétinoïque et d'autres signaux, dont Shh et IGF-2, ce qui favorise la prolifération des cardiomyocytes. Cependant le signal qui initie la prolifération des cardiomyocytes adultes n'a pas encore été identifié. Les cellules épicardiques donnent naissance à des cellules de stabilisation vasculaire dans le tissu régénéré comme elles le font durant la formation normale du cœur. Le pic de prolifération cellulaire se produit 7 jours après la lésion et à ce moment, des séquences régulatrices contrôlant l'expression de gata4, qui code un facteur de transcription impliqué dans le développement cardiaque, sont activées partout dans la couche externe du myocarde. Le nouveau tissu cardiaque est en grande partie constitué par la descendance de cellules chez lesquelles ces séquences régulatrices associées à gata4 ont été activées. D'autres gènes également impliqués dans le développement normal du muscle cardiaque sont exprimés, tel que *nkx2.5*, un marqueur précoce des futures cellules cardiaques (voir Section 11.34). De plus, la synthèse des facteurs de transcription à homéodomaine du poisson-zèbre MsxB et MsxC (apparentés à Msx1) augmente durant la régénération, alors que ces facteurs ne sont pas produits durant le développement cardiaque embryonnaire.

Chez les mammifères, la croissance cardiaque après la naissance est due à l'augmentation en taille des cellules et les taux de prolifération cellulaire sont extrêmement bas. Contrairement au cœur du poisson-zèbre adulte, leur cœur ne peut pas régénérer et le tissu cardiaque est pleinement fonctionnel après une blessure avec formation d'un tissu cicatriciel fibreux. Cependant, les cardiomyocytes d'un cœur de souris adulte peuvent recommencer à se diviser quand des voies de signalisation

ENCART 13F Pourquoi ne peut-on pas régénérer nos membres ?

Des exemples d'animaux adultes qui sont capables de régénérer des organes complexes sont observés partout dans le règne animal. Cette capacité n'est pas seulement restreinte aux animaux possédant une organisation corporelle simple, et parmi ceux-ci tous ne régénèrent pas. Les nématodes par exemple n'ont pas la capacité de régénérer, en raison probablement du fait que leur corps a une pression hydrostatique interne élevée rendant toute cicatrisation impossible.

Parmi les vertébrés, les salamandridés adultes tels que les tritons et l'axolotl, peuvent reconstituer de multiples parties corporelles dont leurs pattes, leurs cristallins et leur cœur alors que des mammifères ne peuvent que reconstituer la toute extrémité de leurs doigts et remédier à une blessure cardiaque seulement durant la première semaine post-natale. Pourquoi donc les tritons et d'autres salamandridés montrent-ils d'aussi remarquables capacités régénératrices alors que les mammifères, dont les humains, ne possèdent cette aptitude que de manière si limitée ? L'idée qui prévalait encore récemment était que la capacité à régénérer que présentent certains adultes de vertébrés est une propriété fondamentale de ce groupe, et que les mammifères et d'autres vertébrés qui ne peuvent pas régénérer, l'auraient perdue au cours de leur histoire évolutive. En effet, des études menées chez des non-vertébrés ont montré que la variabilité de l'aptitude à régénérer observée chez des annélides très proches phylogénétiquement, était probablement due à une perte de ce pouvoir chez certaines espèces au cours de l'évolution.

Chez les salamandridés adultes, cependant, il y a de fortes preuves pour penser que l'aptitude à régénérer a évolué de façon indépendante dans ce groupe. La première indication de cela est la découverte que Prod1, la protéine clé qui code les valeurs de position proximo-distales dans les membres d'amphibien en régénération (voir Section 13.18), est une protéine spécifique des salamandridés qui ne possède pas d'homologues chez les mammifères. Une analyse récente du transcriptome de tritons a permis d'identifier plusieurs gènes supplémentaires qui codent des protéines nouvelles n'ayant apparemment pas d'homologues chez les mammifères, et il a déjà été montré que le taux de transcrits de certains de ces gènes se modifie au cours de la régénération (Figure 1).

L'intérêt porté à ces molécules nouvelles impliquées dans la régénération chez le triton diffère de beaucoup des recherches précédentes sur la régénération qui se concentraient sur des molécules et des voies de signalisation connues pour être conservées durant le développement embryonnaire. Combien de nouvelles protéines interagissent avec ces voies durant la régénération des membres ? Concernant cette question, quelques idées ont émergées récemment à partir d'études relatives à Prod1, où il a été montré que l'expression du gène *Prod1* de triton est régulée par l'homéoprotéine Meis. Celle-ci était déjà connue comme impliquée dans la spécification des valeurs de position dans le développement des membres chez le poulet et la souris (voir Section 11.6). Comme *Prod1*, elle



Figure 1

Adaptée de Mihaylova, Y., Aboobaker, A.A. : What is it about eye of **newt ?** Genome Biol. 2013, **14** : 106.

est, dans les membres d'amphibien en régénération, fortement exprimée dans les blastèmes proximaux comparativement aux blastèmes distaux, bien qu'à la différence de *Prod1*, elle ne soit pas exprimée dans des membres intacts. L'interaction entre *Prod1* et Meis, qui se produit à la suite d'une amputation de membre, pourrait être impliquée dans la spécification proximale des valeurs de position dans les blastèmes de membres en régénération.

Cette nouvelle approche concernant la question de savoir pourquoi les tritons ont d'aussi grandes aptitudes à régénérer, permet d'envisager de nouveaux moyens pour aborder les raisons de notre incapacité à pouvoir régénérer. spécifiques sont activées, mais le fait que très peu de cellules soient impliquées, ne permet pas une restauration de la fonction adulte. Il existe cependant, chez la souris, une brève période juste après la naissance, quand le cœur est pleinement fonctionnel, où une régénération peut se produire après une ablation chirurgicale de l'extrémité du ventricule gauche (ablation de 15 % du myocarde ventriculaire). Une analyse génétique du lignage cellulaire a montré que, comme chez le poisson-zèbre, les nouveaux cardiomyocytes dérivent de cardiomyocytes pré-existants. Une autre similitude avec la régénération cardiaque chez le poisson-zèbre est que se produit une activation épicardique. Ainsi, bien que le cœur du poisson-zèbre diffère de celui des mammifères, en n'ayant qu'un seul ventricule, comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans sa régénération sera utile pour appréhender la régénération cardiaque des mammifères.

La capacité du cœur de souris à régénérer est perdue quand celle-ci est âgée de 7 jours. Une des molécules qui bloque l'entrée des cardiomyocytes en mitose est Meis1, un facteur de transcription à homéodomaine nécessaire pour le développement du cœur embryonnaire. Une inactivation de *Meis1* spécifiquement dans les cardiomyocytes adultes, fait qu'ils entrent en division cellulaire et prolifèrent sans subir d'hyper-trophie. Inversement, la surexpression post-natale de *Meis1* réduit la prolifération des cardiomyocytes et empêche la régénération normalement observée dans la première semaine après la naissance. Il existe des preuves que Meis1 agit en contrôlant directement l'expression des gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire.

RÉSUMÉ

Les amphibiens urodèles peuvent régénérer leur queue et leurs pattes. Les tissus du moignon au niveau d'une amputation se dédifférencient dans un premier temps pour former un blastème qui ensuite grossit et donne naissance à une structure régénérée. Les cellules dédifférenciées du blastème sont à l'origine des différents types cellulaires des membres régénérés et ont généralement un lignage restreint correspondant à celui de leur tissu d'origine. La régénération est habituellement dépendante de la présence de nerfs qui fournissent un facteur de croissance essentiel, mais des membres n'ayant jamais été innervés peuvent régénérer. La régénération est toujours à l'origine de structures ayant des valeurs de position plus distales que celles existant au site de l'amputation. Quand un blastème est greffé sur un moignon avec des valeurs de position différentes, se produit une intercalation proximo-distale des valeurs de position manguantes. Les valeurs de position peuvent être reliées à un gradient proximo-distal d'une protéine de surface cellulaire. L'acide rétinoïque modifie les valeurs de position des cellules du blastème, en leur octroyant des valeurs plus proximales. Les pattes d'insectes peuvent également régénérer, avec une intercalation des valeurs de position manquantes se réalisant à la fois dans des directions proximo-distale et circonférentielle. Le cœur adulte peut régénérer chez les amphibiens et les poissons. Durant la première semaine post-natale, le cœur de la souris peut également régénérer. Chez le poisson-zèbre adulte et la souris nouveau-née, le nouveau tissu myocardique provient d'une prolifération de cardiomyocytes pré-existants et ceci est favorisé par des interactions avec les cellules épicardiques de la couche externe du cœur.



Vieillissement et sénescence

Les organismes ne sont pas immortels, même s'ils réchappent aux maladies et aux accidents. Avec le vieillissement, qui se manifeste avec le temps, se produit une augmentation de la détérioration des fonctions physiologiques, qui réduit les capacités du corps à gérer des stress variés et accentue les risques d'être malade. Ce déclin des fonctions lié à l'âge est connu comme étant la **sénescence**. Un vieillissement est observé chez la plupart des animaux pluricellulaires, mais de notables exceptions existent avec les cnidaires (anémones de mers, hydre et les espèces apparentées) et les planaires. Toutes les espèces se reproduisant sexuellement vieillissent, à la différence de la plupart de celles ayant une multiplication asexuée. L'hydre dont la capacité à régénérer a été évoquée dans l'Encart 13D, ne vieillit pas jusqu'au moment où elle débute sa différenciation sexuelle. Les mécanismes qui sous-tendent le phénomène de sénescence sont encore largement incompris, mais certaines questions générales peuvent être envisagées, notamment de savoir si la sénescence fait partie du programme du développement post-embryonnaire des organismes ou si elle est le résultat d'une usure de ceux-ci. Les cellules germinales ne vieillissent pas, et si ce n'était pas le cas, les espèces disparaîtraient.

Bien que la période à laquelle apparaissent des aspects particuliers du vieillissement varie d'un individu à l'autre, chez la majorité des espèces animales dont l'homme, l'effet global se résume en une probabilité accrue de mourir, l'âge augmentant. Le profil d'une vie, illustré ici à propos de la drosophile (Fig. 13.39) est typique de beaucoup d'animaux, mais il y a peu de preuve que le vieillissement contribue à la mortalité dans la nature. Ainsi plus de 90 % des souris sauvages meurent au cours de leur première année. Il y a cependant des exceptions, telle celle du saumon du Pacifique, chez lequel la mort ne survient pas suite à un processus graduel de vieillissement, mais est liée à un certain stade du cycle vital, ici celui du frai.

Une des opinions concernant le vieillissement est que celui-ci résulte d'une accumulation de dommages qui fait que les capacités du corps à pouvoir se réparer lui-même sont dépassées et qui conduit à une perte des fonctions essentielles. Par exemple, un vieil éléphant meurt de faim suite à la perte de ses dents. Le nématode *Caenorhabditis elegans* vit en moyenne une vingtaine de jours et le principal changement lié à l'âge est une détérioration progressive de ses muscles. Celle-ci a un effet aléatoire sur la durée de vie, qui varie entre 10 et 30 jours. Néanmoins, il y a une preuve évidente que la sénescence est sous contrôle génétique dans la mesure où les diverses espèces vieillissent à des vitesses très variables, comme le démontre les différences de durée de vie (Fig. 13.40). Un éléphant, par exemple, naît au bout de 21 mois de gestation et à ce stade montre peu, voire aucun signe de vieillissement alors qu'une souris âgée de 21 mois est déjà d'âge mûr et commence à montrer des signes de sénescence.

Le contrôle génétique du vieillissement peut être compris selon la théorie du « soma jetable », qui le place dans le contexte de l'évolution. Cette théorie propose que la sélection naturelle conditionne le cycle vital de l'organisme de manière à ce que des ressources suffisantes soient investies dans le maintien des mécanismes de réparation prévenant le vieillissement, au moins jusqu'au moment où l'organisme s'est reproduit et a pris soin de ses jeunes. Ainsi les souris, qui commencent à se reproduire quand elles sont âgées juste de quelques mois, ont besoin de maintenir leurs mécanismes de réparation beaucoup moins longtemps que les éléphants, qui ne commencent à se reproduire qu'à l'âge de 13 ans environ. Chez la plupart des espèces sauvages, peu d'individus vivent assez longtemps pour montrer des signes évidents de sénescence et celle-ci a besoin d'être seulement retardée jusqu'à l'accomplissement de la reproduction. Les cellules ont de nombreux mécanismes retardant le vieillissement, qui sont assez similaires à ceux utilisés pour se préserver d'une transformation maligne. Ces mécanismes protègent la cellule de dommages internes causés par des réactifs chimiques et, de manière continue, réparent les détériorations de l'ADN qui se produisent dans les cellules vivantes même quand elles ne se divisent pas activement. Ils sont particulièrement actifs dans les cellules germinales.

13.23 Les gènes peuvent modifier le déroulement de la sénescence

Les longévités maximales relevées chez les animaux montrent des différences considérables (voir Fig. 13.40). L'espèce humaine peut vivre 120 ans, quelques chouettes,



Fig. 13.39 Vieillissement de la drosophile. La mortalité augmente rapidement aux âges les plus avancés.

Longévité et durée d'atteinte de la maturité sexuelle reproductrice lors de la puberté pour divers mammifères				
	Longévité maximale (mois)	Durée de gestation (mois)	Age de la puberté (mois)	
Homme	1440	9	144	
Rorqual commun	960	12	~72	
Éléphant asiatique	840	21	156	
Cheval	744	11	15	
Chimpanzé	720	8	120	
Ours brun	468	7	72	
Chien	348	2	7	
Vache	588	9	15	
Singe Rhésus	480	5.5	36	
Chat	486	2	8	
Porc	276	4	5	
Singe-écureuil	180	5	30	
Mouton	276	5	7	
Écureuil gris	180	1.5	12	
Lapin européen	156	1	4	
Cochon d'Inde	90	2	2	
Rat	56	0.7	2	
Hamster doré	48	0.5	2	
Souris	48	0.7	1.5	

68 ans, les chats, 28 ans, le xénope, 15 ans, les souris, 3 ans et demi, et les nématodes environ 25 jours. Des mutations géniques affectant la durée de vie ont été identifiées chez *C. elegans*, la drosophile, les souris et l'espèce humaine et peuvent donner des indications pour comprendre les mécanismes impliqués. La capacité à résister à un dommage de l'ADN et les effets des radicaux oxydants sont importants.

Une larve de stade 1 de C. elegans se trouvant après son éclosion dans un environnement peu peuplé et offrant une nourriture abondante, se développe jusqu'à l'âge adulte et peut survivre 25 jours. Toutefois, dans des conditions de surpeuplement et de nourriture peu abondante, l'animal entre dans un troisième stade larvaire quiescent, connu sous le nom de stade dauer. La larve ne se nourrit pas et ne grossit pas jusqu'au moment où de la nourriture redevient disponible. Quand les conditions deviennent favorables, la larve dauer mue et donne naissance au quatrième stade larvaire. Le stade dauer peut perdurer 60 jours et n'a pas d'effets sur la durée de vie post-dauer : il est donc considéré comme un état dans lequel la larve ne vieillit pas. Un système de signalisation insuline/IGF-1 joue un rôle important, d'une part, dans le contrôle de l'entrée en stade dauer en réponse à un stress et, d'autre part, chez C. elegans et aussi la drosophile, dans l'ensemble du contrôle de la fertilité, de la durée de vie et du métabolisme. Une réduction de la signalisation insuline/IGF-1 augmente la longévité (Fig. 13.41). C'est le même système hormonal qui est responsable du contrôle du métabolisme et qui promeut la croissance chez la drosophile et les vertébrés comme cela fut évoqué précédemment.

Chez C. elegans, des mutations qui provoquent une forte réduction de l'expression de *daf-2*, qui code un récepteur de la voie de signalisation insuline, bloque le développement au stade dauer. Le rôle normal de DAF-2 est d'être un antagoniste de DAF-16, un facteur de transcription dont l'activité prolonge la durée de vie et accroît la résistance à certains types de stress. Une perte partielle de la fonction de daf-2 entraîne une durée de vie prolongée après le stade dauer mais réduit la fertilité et la viabilité de la descendance, alors qu'une inactivation de daf-2 par interférence à ARN augmente encore plus la durée de vie, sans raccourcir le stade dauer. La présence d'une lignée germinale semble avoir un effet négatif sur le prolongement de la longévité. L'élimination des précurseurs des cellules de cette lignée dans des embryons mutants de daf-2 leur procure, tout en les maintenant en bonne santé, une durée de vie moyenne de 125 jours qui équivaudrait à 500 ans chez les humains. Mais quand les mutants daf-2 sont cultivés en contact avec des vers de souche sauvage, ils disparaissent au bout de quelques générations, en partie dû à leur baisse de fertilité. L'analyse par puces à ADN des effets de DAF-16 montre que celui-ci active des gènes antimicrobiens et de réponse aux stress. Dans des conditions de laboratoire, il semble

Fig. 13.40 Tableau montrant la durée de vie, le temps de gestation et l'âge de la puberté de divers mammifères. Les chiffres donnés pour les durées de vie sont les longévités maximales observées pour les espèces en question, les espérances de vie moyennes étant habituellement plus faibles. que les animaux âgés chez lesquels la fonction de *daf-16* est inhibée, sont tués par les bactéries qu'ils consomment.

Un système similaire régule le vieillissement chez la drosophile. Des mutations rendant inopérante la voie insuline/IGF-1 double presque la longévité de cet animal, et une restriction calorique augmente également cette dernière. Les mouches mutantes, comme les larves dauer de nématode, entrent en diapause de reproduction ou quiescence. Ces effets sur la durée de vie peuvent être dus à une résistance au stress oxydatif. L'élimination des cellules germinales chez la drosophile augmente également la longévité, en raison probablement des effets de la lignée germinale sur la signalisation insuline. Le vieillissement chez les souris peut être retardé par la baisse de l'activité hypophysaire, et il existe aussi une preuve que des souris femelles porteuses d'une mutation du gène codant le récepteur de l'IGF-1 (qui est le récepteur activé par IGF-1 et IGF-2) peuvent vivre avec un gain de longévité de 33 %.

Il y a des preuves que des dommages oxydatifs accélèrent le vieillissement et que les radicaux oxydatifs sont des acteurs clés des dégradations cellulaires. Chez d'autres animaux, une réduction de la diète alimentaire augmente la durée de vie. Des rats avec une alimentation minimale vivant environ 40 % plus longtemps que des rats pouvant se nourrir comme ils le désirent. Ceci est interprété comme partiellement dû à une exposition moindre à des radicaux libres se formant pendant la dégradation oxydante des nutriments. Ces radicaux sont hautement réactifs et peuvent endommager à la fois l'ADN et des protéines. Des rongeurs possédant une durée de vie longue, génèrent moins d'oxygène réactif que la souris de laboratoire. Le stress oxydatif exerce aussi ses effets délétères sur les mitochondries.

Les êtres humains homozygotes pour une mutation récessive responsable du syndrome de Werner, vieillissent prématurément. Celui-ci se manifeste par un retard de croissance à la puberté et vers vingt ans, les individus ont des cheveux gris et souffrent de maladies variées telles que des maladies de cœur, typiques d'un âge avancé. La plupart des personnes affectées meurent avant 50 ans. Le gène concerné a été identifié et code une protéine impliquée dans la relaxation de l'ADN. Celle-ci est nécessaire pour la réplication et la réparation de l'ADN ainsi que pour l'expression génique. Des défauts de réparation de l'ADN chez les patients présentant ce syndrome pourraient entraîner un niveau de dommages à l'ADN plus élevé que la normale. Cette association entre syndrome de Werner et métabolisme de l'ADN s'accorde avec la possibilité que la vieillesse soit liée à une accumulation de détériorations de l'ADN. Le vieillissement peut aussi être relié à une sénescence cellulaire. La progéria, qui signifie vieillissement prématuré, ou syndrome de Hutchinson-Gilford, est encore plus sévère dans ses effets. Le gène affecté ici code une protéine intranucléaire, la lamine A, et les mutations du gène provoquent une instabilité de la structure de l'enveloppe nucléaire, ce qui signifie que les cellules meurent très probablement de manière prématurée.

13.24 La sénescence cellulaire bloque la prolifération cellulaire

On pourrait penser que lorsque des cellules d'un animal sont isolées, puis mises en culture dans un milieu adéquat contenant des facteurs de croissance, elles peuvent continuer à proliférer presque indéfiniment. Mais ce n'est pas le cas. Par exemple, des cellules de tissus conjonctifs de mammifères, des fibroblastes mis en culture, ne réalisent qu'un nombre limité de division, puis arrêtent définitivement de se diviser (Fig. 13.42). Pour des fibroblastes normaux, le nombre de divisions dépend à la fois de l'espèce et de l'âge de l'animal donneur. Des fibroblastes issus d'un fœtus humain effectuent environ 60 divisions, ceux d'un individu de 80 ans, 30, et ceux d'une souris adulte, environ 12 à 15. Quand les cellules cessent de se diviser, elles apparaissent saines mais sont bloquées en un certain point du cycle cellulaire, souvent en G₀; ce phénomène est connu sous le terme de sénescence cellulaire. Des cellules, prélevées chez des patients atteints du syndrome de Werner chez lesquels beaucoup d'étapes d'un vieillissement normal sont accélérées, se divisent en culture un nombre de fois significativement plus faible que les cellules normales. Cependant, la question de savoir si ce comportement des cellules en culture est révélateur du vieillissement de l'organisme et dans quelle mesure ne reflète-t-il pas la manière dont les cellules sont cultivées reste encore sans réponse.



Fig. 13.41 Facteurs intervenant dans le vieillissement de Caenorhabditis elegans et de la drosophile. Une restriction calorique et l'absence d'une lignée germinale favorisent un allongement de la durée de vie chez les deux espèces. Chez la drosophile, il a été montré que l'effet de la restriction calorique nécessite la déacétylase d'histones Sir2, qui agit probablement sur l'activité génique par sa capacité à modifier la chromatine (voir Encart 8A). Pour C. elegans, il a été montré que la signalisation insuline/ IGF régule la durée de vie par ses effets inhibiteurs sur l'expression du gène codant le facteur de transcription DAF-16, un membre de la famille des facteurs de transcription FoxO.



Un fait partagé par les cellules sénescentes en culture et *in vivo* est le raccourcissement des télomères. Ceux-ci sont des séquences répétées d'ADN à l'extrémité des chromosomes qui préservent l'intégrité de ces derniers, et qui garantissent que ceux-ci se répliquent totalement sans perte de l'information codée à leurs extrémités. La longueur des télomères est moindre dans les cellules des personnes âgées et elle diminue à chaque réplication, ce qui suggère que les télomères ne sont pas complètement répliqués lors de chaque division cellulaire, peut être en lien avec la sénescence. Si la télomérase qui maintient la longueur des télomères et qui est normalement absente dans les cellules en culture, est produite dans ces cellules, alors la sénescence ne se produit pas. Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) contiennent également la télomérase et prolifèrent indéfiniment. Cependant, il n'est pas encore clair si le raccourcissement des télomères est une cause majeure du vieillissement des cellules somatiques, dans la mesure où certaines cellules de rongeurs, telles les cellules de Schwann, peuvent dans des conditions appropriées, proliférer indéfiniment, leurs télomères ne contrôlant pas la réplication.

Les cellules sénescentes qui ne se divisent plus présentent des changements dans la synthèse des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. Les protéines p21 et p16 sont souvent exprimées ; elles font partie des voies des suppresseurs des tumeurs gouvernées par p53 et RB en réponse à un dommage de l'ADN (voir Section 13.5). Elles agissent comme des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines et empêchent qu'une cellule avec un ADN endommagé puisse se diviser. Ceci évite que des cellules sénescentes, avec leur ADN endommagé, ne deviennent cancéreuses.

RÉSUMÉ

Le vieillissement est largement dû à des dommages cellulaires, en particulier par de l'oxygène réactif. La sénescence est le déclin, lié à l'âge, de la capacité à effectuer des réparations et est sous contrôle génétique. Beaucoup de cellules normales en culture ne peuvent réaliser qu'un nombre limité de divisions et ceci est corrélé avec l'âge de l'animal dont elles sont issues et la longévité de celui-ci. Des gènes qui peuvent augmenter la durée de vie ont été identifiés chez *C. elegans* et la drosophile, et ils peuvent agir en augmentant chez l'animal sa résistance à des stress oxydatifs.

Résumé du Chapitre 13

- La morphologie de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux, par exemple, se met en place en miniature lors du développement embryonnaire, puis avec l'augmentation en taille, la forme corporelle de base est maintenue malgré la croissance des diverses régions se réalisant à des vitesses différentes.
- La croissance peut impliquer une multiplication et un accroissement de la taille des cellules, et le dépôt de matériel extracellulaire.
- Le cancer peut être considéré comme une aberration de la croissance dans la mesure où il résulte de mutations qui provoquent une prolifération cellulaire excessive et une incapacité des cellules à se différencier.
- Chez les vertébrés, les structures corporelles possèdent un programme intrinsèque de croissance qui est sous contrôle hormonal.
- Les larves d'arthropodes et de certains autres groupes tels que les grenouilles chez les vertébrés, ne ressemblent pas à l'adulte et une métamorphose leur permet d'acquérir la forme adulte. Les larves des arthropodes sous recouvertes d'une cuticule de chitine relativement inextensible et doivent de ce fait effectuer des mues successives de croissance.
- La régénération est la capacité qu'à un organisme adulte de remplacer une partie corporelle perdue et elle peut impliquer une croissance. Cette capacité varie largement selon les différents groupes d'organismes et aussi entre espèces d'un même groupe. Les mammifères ont des pouvoirs de régénération limités alors que les tritons peuvent régénérer pattes, mâchoires et cristallins.
- La régénération des membres d'amphibiens implique une dédifférenciation cellulaire et la formation d'un blastème, qui grossit et produit le membre régénéré. La régénération nécessite la présence de nerfs.
- La réalité d'un gradient proximo-distal des valeurs de position pour le membre en régénération a été démontrée, car une intercalation des valeurs de position se produit quand des valeurs normalement non voisines sont placées côte à côte dans des membres d'amphibiens et d'insectes.
- Le cœur du poisson zèbre peut régénérer suite à la dédifférenciation des cardiomyocytes et à leur prolifération pour former un nouveau tissu. Au cours de la première semaine post-natale, le cœur d'une souris nouveau-née peut également régénérer selon le même mécanisme.
- Les symptômes du vieillissement (sénescence) apparaissent principalement causés par l'accumulation des dommages subis par les cellules au cours du temps. Le vieillissement est aussi sous contrôle génétique comme le montre des syndromes de vieillissement chez les humains et les effets de mutations chez les nématodes.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Définir le terme « croissance ». Quels sont les principaux mécanismes de la croissance ? Comment la mort cellulaire s'intègre-t-elle dans une discussion sur la croissance ?

2. Pourquoi est-il inapproprié de dire que le cycle cellulaire débute quand la cytodiérèse forme deux cellules après la phase M ? Selon l'analyse moléculaire du cycle cellulaire, à quel point ce dernier démarre-t-il ? Quels sont les événements moléculaires qui définissent ce point de départ ? (Le diagramme du cycle cellulaire de l'Encart 1B pourrait aider à répondre).

3. Par quel moyen le cycle cellulaire standard est-il modifié au cours des 13 divisions pré-cellulaires de l'embryogenèse de la drosophile pour permettre des divisions cellulaires très rapides ? Quelle est la protéine maternelle qui dirige ces divisions précoces et quelle est la fonction de cette protéine ?

4. La taille finale de certains organes tels que le foie et la rate, est contrôlée par des signaux intercellulaires cependant que la taille d'autres organes comme le pancréas ou le thymus est sous le contrôle d'un programme de développement intrinsèque aux cellules. Décrire les expériences montrant l'existence de ces deux mécanismes différents du contrôle de la croissance.

5. Chez la drosophile, la protéine Hippo et le microARN *bantam* (coq nain) ont des fonctions opposées, comme leur nom l'indique. Quelles sont les fonctions de ces deux régulateurs de croissance ? Résumer la voie qui initie la signalisation Hippo et celle du gène *bantam*.

6. Répondre aux questions suivantes concernant l'hormone de croissance humaine : Qu'est-ce que l'hormone de croissance ? Où est-elle produite ? Comment sa synthèse et sa sécrétion sont-elles contrôlées ? Quel autre facteur de croissance est un médiateur majeur de l'effet de l'hormone de croissance sur la prolifération cellulaire?

7. Passer en revue les diverses molécules et voies de signalisation évoquées dans ce chapitre, et indiquer celles qui pourraient être classées comme des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs ?

8. Un têtard de grenouille est exposé expérimentalement à de la thyroxine mise dans son eau d'élevage. Dans une autre expérience, l'ablation de la glande thyroïde est effectuée chez un têtard. Quels résultats peut-on prévoir, en les justifiant, pour chacune de ces expériences ?

9. Discuter le pour et le contre de cette assertion : « Les changements qui se produisent avec le vieillissement constituent une partie inévitable du programme de développement post-embryonnaire génétiquement déterminé chez les animaux ».

10. Comparer morphallaxie et épimorphose. Donner un exemple de chaque.

11. Quel est l'effet d'une dé-innervation sur la régénération d'un membre de salamandre ? Quel est le rôle de l'innervation ? Quelle protéine est capable de se substituer aux nerfs pour assurer une régénération ? Pour quelles raisons un membre qui n'a jamais été innervé est-il capable de régénérer ?

12. Se référer à la Fig. 13.30. Décrire avec ses propres mots, le but de l'expérience illustrée, ce qui a été observé, et quelle interprétation peut être donnée aux résultats de cette expérience.

13. Les cellules dédifférenciées du blastème de salamandre ne régénèrent seulement que les structures distales par rapport au site d'ablation, ce qui nécessite une sorte de mémoire de la position proximo-distale dans le membre intact. Résumer les données montrant que Prod1 peut être impliquée dans la « mémoire » de la position proximo-distale, et s'assurer d'inclure les résultats du traitement à l'acide rétinoïque sur l'expression de Prod1.

14. Décrire l'effet de l'acide rétinoïque sur la régénération. Par exemple si une patte est sectionnée au niveau du poignet et traitée à l'acide rétinoïque, de quelle manière sa régénération sera-t-elle altérée, comparée à une régénération sans un tel traitement ?

15. Dans la régénération d'une patte de blatte, les valeurs de position proximo-distales seront restaurées par l'intermédiaire d'une intercalation si deux parties de patte sont mises en contact par

une greffe (voir Fig. 13.36). Comment ce processus d'intercalation explique-t-il les résultats des expériences rapportées dans la figure ?

16. Discuter l'importance, pour le domaine médical, de la capacité qu'ont certaines parties du cœur du poisson-zèbre adulte à pouvoir régénérer (il est possible de revoir quelques uns des avantages du poisson-zèbre en tant qu'organisme modèle dans le Chapitre 3).

17. Comment la taille d'un muscle est-elle contrôlée ? Discuter si les mêmes règles s'appliquent au contrôle de la taille d'autres organes comme le foie.

QCM

NB. Il n'existe qu'une seule bonne réponse pour chacune des questions posées.

1. Quel sera le résultat d'une greffe d'un bourgeon de patte d'une grande espèce de salamandre *Ambystoma* sur une espèce de taille plus petite ?

- a) Le bourgeon greffé sera incapable de grossir chez le petit animal et sera éliminé.
- b) Le bourgeon greffé grossira selon une taille appropriée à son hôte, et aura ainsi une taille semblable à celle des autres pattes.
- c) Le bourgeon greffé grossira pour devenir un membre plus grand que les autres, reflétant son origine à partir d'une espèce plus grande.
- d) Le bourgeon greffé grossira en étant initialement plus grand que les autres, mais avec le temps se produira une régulation et le membre aura au final la même taille que celle des autres membres de l'hôte.

2. Par quelles molécules de signalisation la croissance est-elle stimulée ?

- a) insuline
- b) IGF-1 et 2
- c) FGF
- d) toutes les molécules citées peuvent stimuler la croissance

3. La croissance en longueur des os longs se réalise chez les vertébrés au niveau de

- a) la diaphyse
- b) l'épiphyse
- c) de plaques de croissance
- d) des centres d'ossification
- **4.** Laquelle de ces propositions est vraie ?
- a) Les gènes impliqués dans le cancer sont tous des oncogènes.
- b) Tous les gènes impliqués dans le cancer sont classés comme gènes suppresseurs de tumeurs.
- c) Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs sont impliqués dans le cancer.
- d) Aucune classification unifiée ne peut être appliquée aux gènes impliqués dans le cancer.
- 5. La mue des insectes et d'autres arthropodes est déclenchée par
- a) l'auxine
- b) l'ecdysone
- c) Hedgehog
- d) l'hormone juvénile

6. Quelle voie de signalisation semble jouer un rôle dans le vieillissement chez plusieurs espèces animales, des nématodes aux souris ? a) ecdysone

- b) FGF
- c) Hippo
- d) insuline/IGF-1

7. Quelle proposition est en accord avec un modèle de vieillissement dans lequel les stress causant un dommage à l'ADN provoquent une sénescence ?

- a) Le syndrome de Werner est une maladie du vieillissement, probablement causé par un défaut de réparation de l'ADN.
- b) Une diète alimentaire chez les mammifères réduit les dommages causés à l'ADN par les radicaux libres dans les mitochondries.
- c) Des cellules sénescentes en culture qui ont cessé de se diviser expriment souvent p21 et p16, protéines qui sont normalement activées lors d'une réponse à un dommage de l'ADN.
- d) Tous ces faits sont cohérents avec un modèle pour le vieillissement fondé sur un dommage de l'ADN.
- 8. L'épimorphose est une régénération se réalisant par
- a) une réorganisation des cellules existantes sans nécessité d'une nouvelle croissance, comme cela se produit chez l'hydre.
- b) une réorganisation des cellules existantes sans nécessité d'une nouvelle croissance, comme cela se produit chez les tritons.
- c) une réinitialisation des divisions des cellules existantes et une nouvelle croissance, suivies d'une organisation, comme cela se produit chez les tritons.
- d) une réinitialisation des divisions des cellules existantes et une nouvelle croissance, suivies d'une organisation, comme cela se produit chez l'hydre.

9. Si l'innervation d'une patte de triton est supprimée avant une amputation, comment la régénération sera-t-elle affectée ?

- a) Un blastème se formera mais ne grossira pas et la régénération fera défaut.
- b) La régénération n'a pas lieu et le moignon cicatrisera comme cela se produirait chez les mammifères.
- c) Un développement se réalisera, mais l'identité de la patte sera perdue et le patron proximo-distal normal ne se mettra pas en place.
- d) La régénération de la plupart des tissus se produira normalement, mais non celle des nerfs.

10. Quel sera le résultat d'une greffe d'un blastème issu d'une amputation distale sur un moignon formé suite à une amputation proximale ?

- a) Dans ce cas, le blastème distal est incapable d'interpréter correctement ses valeurs de position, et la régénération n'a pas lieu.
- b) Le blastème distal régénère la patte entière, en fournissant toutes les cellules nécessaires pour cette régénération.
- c) Le blastème distal régénère les parties de la patte enlevées lors de l'amputation distale, donnant une patte raccourcie dépourvue des régions entre les sites d'amputation proximale et distale.
- d) Les régions de la patte entre les sites d'amputation proximale et distale sont comblées par une croissance intercalaire à partir du moignon proximal, et les régions distales de l'amputation distale sont régénérées à partir du blastème distal.

Réponses aux QCM

1:c, 2:d, 3:c, 4:c, 5:b, 6:d, 7:a, 8:c, 9:a, 10:d.

Références bibliographiques générales

Birnbaum, K.D., Sánchez Alvarado, A. : **Slicing across kingdoms :** regeneration in plants and animals. *Cell* 2008, **132 :** 697–710.

- Brockes, J.P., Kumar, A. : **Principles of appendage regeneration in adult vertebrates and their implications for regenerative medicine**. *Science* 2005, **310 :** 1919–1923.
- Brockes, J.P., Kumar, A. : **Comparative aspects of animal** regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2008, **24 :** 525–549.
- Galliot, B., Tanaka, E., Simon, A. : **Regeneration and tissue repair**. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, **65** : 3–7.
- Goss, R.J. : *The Physiology of Growth*. New York : Academic Press, 1978.
- Kirkwood, T.B.L. : **Understanding the odd science of aging**. *Cell* 2005, **120 :** 437–447.
- *Nature* Insight : **Cell division and cancer**. *Nature* 2004, **432** : 293–341.
- Partridge, L. : The new biology of ageing. *Phil. Trans R. Soc. B* 2010, **365 :** 147–154.

Références bibliographiques spécifiques

13.1 Les tissus croissent par prolifération cellulaire, agrandissement des cellules, ou accrétion

Tumaneng, K., Russell, R.C.Guan, K.-L. : Organ size control by TOR and Hippo pathways. *Curr. Biol.* 2012, 22 : R368–R379.

13.2 La prolifération cellulaire est contrôlée par la régulation de l'entrée dans le cycle cellulaire

Morgan, D.O.: *The Cell Cycle : Principles of Control*. Oxford University Press : 2007.

13.3 Les divisions cellulaires au cours du développement précoce peuvent être contrôlées par un programme de développement intrinsèque

- Edgar, B., Lehner, C.F. : **Developmental control of cell cycle regulators : a fly's perspective**. *Science* 1996, **274 :** 1646–1652. Follette, P.J., O'Farrell, P.H. : **Connecting cell behavior to**
- patterning : lessons from the cell cycle. Cell 1997, 88 : 309–314.

13.4 Des signaux extrinsèques coordonnent les divisions cellulaires, la croissance cellulaire et la mort cellulaire au cours du développement de l'aile de la drosophile

- de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., Johnston, L.A. : *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* 2004, 117 : 107–116.
- Halder, G., Johnson, R.L. : **Hippo signaling : growth control and beyond**. *Development* 2011, **138 :** 9–22.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., Pan, D. : **The Hippo** signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* 2005, **122** : 421–434.

Martin, F.A., Herrera, S.C., Morata, G. : **Cell competition, growth and size control in the** *Drosophila* **wing imaginal disc**. *Development* 2009, **136** : 3747–3756.

Willecke, M., Hamaratoglu, F., Sansores-Garcia, L., Tao, C., Halder, G. : Boundaries of Dachsous cadherin activity modulate the Hippo signaling pathway to induce cell proliferation. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 2008, 105 : 14897–14902.

ENCART 13A Les éléments essentiels de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères

Tumaneng, K., Russell, R.C.Guan, K.-L. : Organ size control by TOR and Hippo pathways. *Curr. Biol.* 2012, 22 : R368–R379.

13.5 Les cancers peuvent être provoqués par des mutations de gènes contrôlant la prolifération cellulaire

- Beachy, P.A., Karhadkar, S.S., Berman, D.M. : **Tissue repair** and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004, **432** : 324–331.
- Harvey, K.F., Zhang, X., Thomas, D.M. : The hippo pathway and human cancer. *Nature Rev Cancer* 2013, 13 : 246–257.
- Hunter, T. : Oncoprotein networks. Cell 1997, 88: 333–346.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., *et al.* : **Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses**. *Science* 2008, **321 :** 1801–1806.

- Shilo, B.Z. : **Tumor suppressors. Dispatches from patched**. *Nature* 1996, **382 :** 115–116.
- Taipale, J., Beachy, P.A. : **The hedgehog and Wnt signalling** pathways in cancer. *Nature* 2001, **411** : 349–353.
- Van Dyke, T. : **p53 and tumor suppression**. *N. Engl. J. Med.* 2007, **356 :** 79–92.

13.6 Les mécanismes de contrôle de la taille peuvent être différents d'un organe à l'autre

- Amthor, H., Huang, R., McKinnell, I., Christ, B., Kambadur, R., Sharma, M., Patel, K. : The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Dev. Biol.* 2002, 251 : 241–257.
- Lui, J.C., Baron, J. : Mechanisms limiting body growth in mammals. *Endocr. Rev.* 2011, **32** : 422–440.
- Shingleton, A.W. : Body-size regulation : combining genetics and physiology. *Curr. Biol.* 2005, **15** : R825–R827.
- Stanger, B.Z. : **The biology of organ size determination**. *Diabetes Obes. Metab.* 2008, **10**: 16–26.
- Stanger, B.Z., Tanaka, A.J., Melton, D.A. : Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not in the liver. *Nature* 2007, 445 : 886–891.

Taub, R. : Liver regeneration : from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, **5** : 836–847.

13.8 Des hormones et des facteurs de croissance coordonnent la croissance des tissus et des organes, contribuant ainsi à déterminer la taille globale du corps

- Efstratiadis, A. : Genetics of mouse growth. *Int. J. Dev Biol.* 1998, **42 :** 955–976.
- Lui, J.C., Baron, J. : Mechanisms limiting body growth in mammals. *Endocr. Rev.* 2011, **32** : 422–440.

 Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V., Efstratiadis, A. : Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol.* 2001, 229 : 141–162.

Sanders, E.J., Harvey S. : **Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor**. *Anat. Embryol*. 2004, **209 :** 1–9.

ENCART 13B Le déterminant principal de la taille du corps des chiens est l'axe Hormone de croissance-IGF-1

- Ostrander, E.A. **Genetics and the shape of dogs**. *Am. Sci.* 2007, **95 :** 406–413.
- Sutter, N.B., Sutter, N.B., Bustamante, C.D., Chase, K., Gray, M.M., Zhao, K., Zhu, L., Padhukasahasram, B., Karlins, E., Davis, S., *et al.*: A single *IGF-1* allele is a major determinant of small size in dogs. *Science* 2007, 316 : 112–115.

Shearin, A.L., Ostrander, E.A.: Canine morphology : hunting for genes and tracking mutations. *PloS Biol.* 2010, 8 : e1000310.

Rimbault, M., Ostrander, E.A. : **So many doggone traits : mapping genetics of multiple phenotypes in the domestic dog.** *Hum. Mol. Genet.* 2012, **21 :** R52–R57

Rimbault, M., Beale, H.C., Schoenebeck, J.J., Hoopes, B.C., Allen, J.J., Kilroy-Glynn, P., Wayne, R.K., Sutter, N.B., Ostrander, E.A. : Derived variants at six genes explain nearly half of size reduction in dog breeds. *Genome Res.* 2013, 23 : 1985–1995.

13.9 L'élongation des os longs est contrôlée par la combinaison d'un programme intrinsèque de croissance et de facteurs extracellulaires

Kember, N.F. : Cell kinetics and the control of bone growth. Acta Paediatr. Suppl. 1993, 391 : 61–65.

Kronenberg, H.M. : **Developmental regulation of the growth plate**. *Nature* 2003, **423 :** 332–336.

Nilsson, O., Baron, J. : Fundamental limits on longitudinal bone growth : growth plate senescence and epiphyseal function. *Trends Endocrinol. Metab.* 2004, 8 : 370–374.

Roush, W. : Putting the brakes on bone growth. *Science* 1996, **273 :** 579.

Schultz, E. : Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev. Biol.* 1996, **175** : 84–94.

Williams, P.E., Goldspink, G. : Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. J. Anat. 1978, 127 : 450–468.

ENCART 13C Le rapport entre la longueur des doigts est déterminé lors du développement embryonnaire

Zheng, Z., Cohn, M.J. : Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2011, 108 : 16289–16294.

Manning, J.T.: *The Finger Book*. London : Faber and Faber, 2008.

Manning, J.T. : Resolving the role of prenatal sex steroids in the development of digit ratio. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2011, 108 : 16143–16144.

13.10 La quantité de nourriture reçue par un embryon peut avoir des effets importants à très long terme

Barker, D.J. : The Wellcome Foundation Lecture. 1994: **The fetal** origins of adult disease. *Proc. R. Soc. Lond.* 1995, **262** : 37–43.

Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Cooper, C., Thornburg, K.L. : Effect of *in utero* and early-life conditions on adult health and disease. *N. Engl. J. Med.* 2008, **359** : 61–73.

13.12 La taille du corps des insectes est déterminée par la vitesse et la durée de la croissance larvaire

Andersen, D.S., Colombani, J., Leopold, P. : **Coordination of** organ growth : principles and outstanding questions from the world of insects. *Trends Cell Biol.* 2013, **23** : 336–344.

De Loof, A. : Ecdysteroids, juvenile hormone and insect neuropeptides : Recent successes and remaining major challenges. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008, **155** : 3–13.

Mirth, C.K., Riddiford, L.M. : Size assessment and growth control : how adult size is determined in insects. *BioEssays* 2007, **29** : 344–355.

Mirth C.K., Shingelton, A.W. Integrating body and organ size in *Drosophila* : recent advances and outstanding problems. *Front. Endocr.* 2012, **3**: 1–13.

Nijhout, H.F. : Size matters (but so does time), and it's OK to be different. *Dev. Cell* 2008, 15: 491–492.

Stern, D. : Body-size control : how an insect knows it has grown enough. Curr. Biol. 2003, 13 : R267–R269.

Thummel, C.S. : Flies on steroids—*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet*. 1996, **12** : 306–310.

13.13 La métamorphose des amphibiens est sous contrôle hormonal

Brown, D.D., Cai, L. : **Amphibian metamorphosis**. *Dev. Biol.* 2007, **306** : 20–33.

Huang, H., Brown, D.D. : Prolactin is not juvenile hormone in *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000, 97 : 195–199.

Tata, J.R. : *Hormonal Signaling and Postembryonic Development*. Heidelberg : Springer, 1998.

13.14 Il existe deux types de régénération, la morphallaxie et l'épimorphose

ENCART 13D Régénération de l'hydre

Bode, H.R. : **The head organizer in** *Hydra*. *Int. J. Dev. Biol.* 2012, **56** : 473–478.

Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B., Bode, H.R. : Formation of the head organizer in Hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development* 2005, **132** : 2907–2916.

Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.C., Galliot, B. : Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev. Cell* 2009, 17 : 279–289.

Galliot, B. : **Regeneration in Hydra**. eLS (Wiley, 2013). 10.1002/9780470015902.a0001096.pub3.

Hicklin, J., Wolpert, L. : Positional information and pattern regulation in *Hydra* : the effect of gamma-radiation. J. Embryol. Exp. Morph. 1973, 30 : 741–752.

Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., von Laue, C.C., Snyder, P., Rothbächer, U., Holstein, T.W. : WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hvdra*. *Nature* 2000. **407** : 186–189.

Müller, W.A. : Pattern formation in the immortal *Hydra*. *Trends Genet*. 1996, **12** : 91–96.

Takahashi, T., Fujisawa, T. : Important roles for epithelial cell peptides in hydra development. *BioEssays* 2009, **31** : 610–619.

Wolpert, L., Hornbruch, A., Clarke, M.R.B. : Positional information and positional signaling in *Hydra*. Am. Zool. 1974, 14: 647–663.

ENCART 13E Régénération des planaires

Adell, T., Cebrià, F., Saló, E. : Gradients in planarian regeneration and homeostasis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010, 2 : a000505.

Adell, T., Saló, E., Boutros, M., Bartscherer, K. : **Smed-Evi**/ **Wntless is required for beta-catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration**. *Development* 2009, **136 :** 905–910.

De Robertis, E.M. : Wnt signaling in axial patterning and regeneration : lessons from planaria. *Sci. Signal.* 2010, **3** : pe21.

Newmark, P.A., Sánchez-Alvarado, A. : **Regeneration in planaria**. *eLS* (Wiley, 2001). doi : 10.1038/npg.els.0001097

Reddien, P.W. : **Specialized progenitors and regeneration**. *Development* 2013, **140** : 951–957.

Reddien, P.W., Sánchez Alvarado, A. : Fundamentals of planarian regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004, **20** : 725–757.

Simon, A. : On with their heads. *Nature*, 2013, 500 : 32–33.

Wagner, D.E., Wang, I.E., Reddien, P.W. : Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science*, 2011, **332** : 811–816.

13.15 La régénération des pattes chez les amphibiens et les insectes implique l'épimorphose

- Ferretti, P., **Regeneration of vertebrate appendages**. eLS. (Wiley, 2013) 10.1002/9780470015902.a0001099.pub3
- Hopkins, P.M., **Regeneration in insects and crustaceans**. eLS. (Wiley, 2001) doi : 10.1038/npg.els.0001098

13.16 La régénération de la patte d'amphibien implique une dédifférenciation cellulaire et une nouvelle croissance

Alvarado, A.S. : A cellular view of regeneration. *Nature News* and Views, 2009, 460 : 39–40.

Brockes, J.P., Kumar, A. : Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002, 3: 566–574.

Godwin, J.W., Pinto, A.R., Rosenthal, N.A. : Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2013, **110** : 9415–9420.

Imokawa, Y., Simon, A., Brockes, J.P. : A critical role for thrombin in vertebrate lens regeneration. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2004, 359 : 765–776.

Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., Tanaka, E.M. : Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 2009, 460 : 60–65.

Kumar, A., Velloso, C.P., Imokawa, Y., Brockes, J.P. : The regenerative plasticity of isolated urodele myofibers and its dependence on MSX1. *PLoS Biol.* 2004, 2 : E218.

Nacu, E., Glausch, M., Le, H. Q., Damanik, R.F.F., Schuez, M., Knapp, D., Khattak, S., Richter, T., Tanaka, E.M. : Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl. *Development* 2013, 140 : 513–518.

Sandoval-Guzmán, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., Tazaki, A., Joven, A., Tanaka, E.M., Simon, A. : Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell* 2013, 14 : 174–187.

Satoh, A., Graham, G.M.C., Bryant, S.V., Gardiner, D.M. : Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev. Biol.* 2008, **319** : 321–355.

Tanaka, E.M., Drechel, D.N., Brockes, J.P. : **Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes**. *Curr. Biol.* 1999, **9**: 792–799.

13.17 La régénération des pattes chez les amphibiens dépend de la présence de nerfs

- Kumar, A., Godwin, J.W., Gates, P.B., Garza-Garcia, A.A., Brockes, J.P. : Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 2007, 318 : 772–777.
- Kumar, A., Delgado, J.P., Gates, P.B., Neville, G., Forge, A.,
 Brockes, J.P. : The aneurogenic limb identifies developmental cell interactions underlying vertebrate limb regeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2011, 108 : 13588–13593.

13.18 Le blastème donne naissance à des structures ayant des valeurs de position distales par rapport au site de l'amputation

- Da Silva, S., Gates, P.B., Brockes, J.P. : New ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration. *Dev. Cell* 2002, **3**: 547–551.
- Echeverri, K., Tanaka, E.M. : **Proximodistal patterning during limb regeneration**. *Dev. Biol.* 2005, **279** : 391–401.

Roensch, K., Tazaki, A., Chara, O., Tanaka, E.M. : **Progressive specification rather than intercalation of segments during limb regeneration**. *Science* 2013, **342** : 1375–1379.

13.19 L'acide rétinoïque peut modifier les valeurs de position proximo-distales dans des membres en cours de régénération

Maden, M. : The homeotic transformation of tails into limbs in *Rana temporaria* by retinoids. *Dev. Biol.* 1993, **159** : 379–391.

Mercader, N., Tanaka, E.M., Torres, M. : **Proximodistal identity during limb regeneration is regulated by Meis homeodomain proteins**. *Development* 2005, **132** : 4131–4142.

Pecorino, L.T., Entwistle, A., Brockes, J.P. : Activation of a single retinoic acid receptor isoform mediates proximo-distal respecification. *Curr. Biol.* 1996, 6 : 563–569.

Scadding, S.R., Maden, M. : Retinoic acid gradients during limb regeneration. *Dev. Biol.* 1994, 162 : 608–617.

13.20 Les mammifères peuvent régénérer leurs extrémités digitales

Han, M., Yang, X., Farrington, J.E., Muneoka, K. : Digit regeneration is regulated by *Msx1* and BMP4 in fetal mice. *Development* 2003, **130** : 5123–5132.

Han, M., Yang, X., Lee, J., Allan, C.H., Muneoka, K. : Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Dev. Biol.* 2008, **315** : 125–135.

Rinkevich, Y., Lindau, P., Ueno, H., Longaker, M.T., Weissman, I.L. : Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. *Nature* 2011, **476** : 409–413.

Takeo, M., Chou, W.C., Sun, Q., Lee, W., Rabbani, P., Loomis, C.,Taketo, M.M., Ito, M. : Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration. *Nature* 2013, 499 : 228–232.

ENCART 13F Pourquoi ne peut-on pas régénérer nos membres ?

Bely, A.E. : Evolutionary loss of animal regeneration : pattern and process. *Integr.Comp. Biol.* 2010, **50 :** 515–527.

Garza-Garcia, A.A., Driscoll P.C., Brockes, J.P. : Evidence for the local evolution of mechanisms underlying limb regeneration in salamanders. *Integr.Comp. Biol.* 2010, **50** : 528–535.

Mihaylova, Y., Aboobaker, A.A. : What is it about eye of newt ? *Genome Biol.* 2013, 14 : 106.

Shaikh, N., Gates, P.B., Brockes, J.P. : The Meis homeoprotein regulates the axolotl *Prod 1* promoter during limb regeneration. *Gene* 2011, **484** : 69–74.

13.21 Les pattes des insectes intercalent des valeurs de position à la fois par des croissances proximo-distale et circonférentielle

Bando, T., Mito, T., Maeda, Y., Nakamura, T., Ito, F., Watanabe, T., Ohuchi, H., Noji, S. : Regulation of leg size and shape by the Dachsous/Fat signalling pathway during regeneration. *Development* 2009, 136 : 2235–2245. French, V. : Pattern regulation and regeneration. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1981, **295** : 601–617.

Nakamura, T., Mito, T., Miyawaki, K., Ohuchi, H., Noji, S. : EGFR signaling is required for re-establishing the proximodistal axis during distal leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus* nymph. *Dev. Biol.* 2008, 319 : 46–55.

13.22 La régénération du cœur du poisson-zèbre implique la reprise des divisions des cardiomyocytes

Ahmed I. Mahmoud, A.I., Fatih Kocabas, F., Shalini A., Muralidhar, S.A., Wataru Kimura, W., Ahmed S. Koura, A.S., Suwannee Thet, S., Enzo R. Porrello, E.R., Hesham A. Sadek, H.A. : Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell-cycle arrest. *Nature* 2013, 497 : 249–253.

Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., Poss, K.D. : **The zebrafish as a model for complex tissue regeneration**. *Trends Genet*. 2013, **29 :** 611–620.

Itou, J., Oishi, I., Kawakami, H., Glass, T.J., Richter, J., Johnson, A., Lund, T.C., Kawakami, Y. : **Migration of cardiomyocytes is essential for heart regeneration in zebrafish**. *Development* 2012, **139** : 4133–4142.

Oyama, K., El-Nachef, D., MacLellan, WR. : Regeneration potential of adult cardiac myocytes. *Cell Res.* 2013, 23 : 978–979.

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., Sadek, H.A. : Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 2011, 331 : 1078–1080.

Poss, K.D., Wilson, L.G., Keating, M.T. : Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002, **298** : 2188–2190.

Zhang, R., Han, P., Yang, H., Ouyang, K., Lee, D., Lin, Y.-F., Ocorr, K., Kang, G., Chen, J., Stainier, D.Y.R., Yelon, D., Chi, N.C. : In vivo cardiac reprogramming contributes to zebrafish heart regeneration. *Nature* 2013, **498** : 497–501.

13.23 Les gènes peuvent modifier le déroulement de la sénescence

Arantes-Oliviera, N., Berman, J.R., Kenyon, C. : Healthy animals with extreme longevity. *Science* 2003, 302 : 611. Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F. : Cellular senescence : when bad things happen to good cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007, 8 : 729–740.

Finkel, T., Serrano, M., Blasco, M.A. : The common biology of cancer and ageing. *Nature* 2007, **448** : 767–774.

Harper, M.E., Bevilacqua, L., Hagopian, K., Weindruch, R., Ramsey, J.J. : Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. Acta Physiol. Scand. 2004, 182 : 321–331.

Kenyon, C. : The plasticity of aging : insights from long-lived mutants. Cell 2005, 120 : 449–460.

Kipling, D., Davis, T., Ostler, E.L., Faragher, R.G. : What can progeroid syndromes tell us about human aging ? *Science* 2004, **305** : 1426–1431.

Kudlow, B.A., Kennedy, B.K., Monnat, R.J. : Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes : mechanistic basis of progerial diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8 : 394–404.

Murphy, C.T., Partridge, L., Gems, D. : Mechanisms of ageing : public or private. *Nat Rev. Genet.* 2002, **3** : 165–175.

Partridge, L. : Some highlights of research on aging with invertebrates. *Aging Cell* 2008, **7**: 605–608.

Tatar, M., Bartke, A., Antebi, A. : The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 2003, **299** : 1346–1351.

Weindruch, R. : Caloric restriction and aging. *Science* 1996, 274 : 46–52.

13.24 La sénescence cellulaire bloque la prolifération cellulaire

Shay, J.W., Wright, W.E. : When do telomeres matter ? Science 2001, 291 : 839–840.

Sherr, C.J., DePinho, R.A.: Cellular senescence : mitotic clock or culture shock. *Cell* 2000, 102 : 407–410.

14

Évolution et développement

- L'évolution du développement
- Les modifications évolutives du
- développement embryonnaire
- Les changements dans la durée, la vitesse
- et la chronologie des processus de développement

L'évolution des organismes multicellulaires est fondamentalement liée au développement embryonnaire, car c'est au travers du développement que les changements génétiques provoquent des modifications du corps pouvant passer d'une génération à la suivante. Cela suscite des questions sur les liens entre les processus de développement et les processus évolutifs. Comment le développement évolue-t-il ? Comment le développement embryonnaire a-t-il été modifié au cours de l'évolution des animaux ? Quelle est l'importance des changements de durée, de vitesse et de chronologie des processus de développement ? Ces questions générales seront traitées grâce à des exemples précis chez les animaux.

Des données paléontologiques, moléculaires et cellulaires indiquent que les animaux (les métazoaires), qui sont tous multicellulaires, descendent d'un ancêtre commun lui-même multicellulaire et issu d'un organisme unicellulaire. Une vision simplifiée de l'évolution des animaux est montrée dans la Fig. 14.1. L'histoire évolutive des organismes vivants se déroule sur des milliards d'années et ne peut être reconstruite qu'indirectement grâce à l'étude des fossiles et par la comparaison des organismes actuels. Comme le proposa Charles Darwin, la variabilité génétique et la sélection sont deux composantes majeures de l'évolution biologique (Encart 14A).

L'évolution des organismes vivants multicellulaires est le résultat de modifications du développement embryonnaire, qui sont elles-mêmes dues à des modifications héréditaires du contrôle du comportement et du devenir des cellules de l'embryon. Il est également vrai, comme l'a dit Theodosius Dobzhansky, que rien n'a de sens en biologie, sinon à la lumière de l'évolution et de nombreux aspects du développement ne peuvent être correctement appréhendés sans une perspective évolutive. Ainsi, malgré des modes de développement précoce très différents, tous les embryons de vertébrés passent par un stade assez similaire, après lequel leurs développements divergent à nouveau beaucoup (Fig. 3.2). Ce stade commun, appelé stade phylotypique, qui se situe après la neurulation et la formation des somites, correspond à un stade par lequel un ancêtre lointain des vertébrés est lui aussi passé. Il a persisté depuis lors pour devenir une caractéristique fondamentale du développement des vertébrés, alors que les stades précédents et suivants ont évolué différemment chez les différents vertébrés.

624 Chapitre 14 Évolution et développement

Quelques événements majeurs de l'évolution des métazoaires				
Période	Age (millions d'années, Ma)	Paléontologie (données fossiles)	Évolution génétique, cellulaire et moléculaire	
Quaternaire	0.2 2.6	Premiers fossiles d'Homo sapiens		
Néogène (Tertiaire)	4-5 ~8 23	Premiers fossiles d'hominidés (par exemple Ardipithecus (controversé) et Australopithecus)	Date estimée, sur la base d'analyses de l'ADN du dernier ancêtre commun de l'espèce humaine et des chimpanzés	
Paléogène (Tertiaire)	66	Radiations des mammifères, oiseaux et insectes		
Crétacé	145	(a) Extinction de masse de la limite Crétacé-Tertiaire ; extinction des dinosaures (b) Premiers oiseaux		
Jurassique	200	Domination des dinosaures		
Trias	252	(a) Extinction de masse de la fin du Trias (b) Premiers mammifères (c) Premiers dinosaures		
Permien	298	(a) Extinction de masse de la limite Permien-Trias (b) Radiation des « reptiles »		
Carbonifère	359	(a) Premiers « reptiles » (premiers amniotes) (b) Premiers tétrapodes sur la terre ferme	Évolution de la kératine (le composant principal des écailles, plumes et poils)	
Dévonien	419	 (a) Extinction de masse du Dévonien supérieur (b) Premiers amphibiens (c) Diversification des « poissons » osseux (d) Premiers tétrapodes (e) Premiers insectes (f) Premiers « poissons » osseux (g) Invasion de la terre ferme par des arthropodes 	Évolution des membres des tétrapodes à partir des nageoires Évolution de l'os	
Silurien	445	« Poissons » à mâchoires (gnathostomes)		
Ordovicien	485	Extinction de masse de la limite Ordovicien-Silurien		
Cambrien	541	 (a) Fossiles de « poissons » sans mâchoires (agnathes) (b) Premiers fossiles connus de vertébrés - un crâniate (un animal avec un crâne cartilagineux ou osseux) dépourvu de mâchoires (c) Explosion cambrienne : fossiles de Chine (524 Ma), des schistes de Burgess (505 Ma) et d'ailleurs, incluant des arthropodes, échinodermes, chordés et peut-être des vertébrés dépourvus de mâchoires (d) Premiers fossiles d'arthropodes, d'échinodermes et de mollusques à coquille (e) Biominéralisation répandue 	Formation des chaînes α et β de l'hémoglobine par duplication génique Duplications de génome dans la lignée conduisant aux vertébrés Évolution des crêtes neurales Établissement des plans d'organisation de tous les phyla d'animaux actuels pendant le Cambrien Organisation phylotypique des métazoaires Segmentation métamérique Complexes de gènes Hox	
Précambrien	~600 1200 1500 2000 3500 ~4600	 (a) Fossiles d'animaux constructeurs de récifs avec un squelette minéralisé (b) Premier fossile d'un bilatérien (c) Premiers fossiles de cnidaires (d) Abondants fossiles de la faune de l'Édiacarien, les premières formes de vie multicellulaires complexes. Ce que représentent exactement ces fossiles énigmatiques reste controversé (e) Premiers fossiles d'éponges (f) Premier cas caractérisé de reproduction sexuée (chez une algue rouge) (g) Radiations majeures des eucaryotes (h) Premiers indications raisonnables de l'existence de la vie (tapis microbiens) (j) Formation de la Terre 	Gènes Hox Évolution du collagène	

Fig. 14.1 Quelques événements choisis de

l'évolution des métazoaires. La durée des périodes géologiques n'est pas à l'échelle. Les événements paléontologiques durant chaque période sont indiqués dans l'ordre chronologique.

Modifié d'après Gerhardt, J. and Kirschner, M. : Cells, Embryos, and Évolution : Towards a Cellular and Developmental Understanding of Phenotypic Variation and Evolutionary Adaptability. Blackwell, 1997 Les changements génétiques du développement qui produisent des formes adultes plus aptes à se reproduire ou mieux adaptées à leur environnement, ont été sélectionnés au cours de l'évolution. Les changements dans le développement se déroulant avant la neurulation sont souvent associés à des modifications de la reproduction ; ceux affectant le développement après la neurulation sont plutôt associés à l'évolution de la morphologie de l'animal. La variabilité génétique liée aux mutations, à la reproduction sexuée et à la recombinaison génétique, existe dans les populations de toutes les espèces considérées dans ce livre et fournit de nouveaux phénotypes sur lesquels la sélection peut agir.

Les modifications génétiques qui jouent un rôle dans l'évolution, peuvent concerner à la fois la régulation de l'expression génique et la structure des protéines (en générant de nouvelles fonctions protéiques). Il y a de nombreux arguments en faveur de l'impact direct de changements dans la structure des protéines sur la biochimie de

ENCART 14A Les pinsons de Darwin

Les « pinsons de Darwin » constituent un bon exemple du rôle évolutif du développement et des changements d'expression génique. Charles Darwin visita les Îles Galapagos en 1835 et collecta un ensemble de pinsons qu'il classa dans treize espèces proches. Ce qu'il trouva particulièrement remarquable était la variation dans la forme et la taille de leurs becs. Il écrivit dans le *Voyage du Beagle :* « il est remarguable qu'une gradation presque parfaite de structures peut être observée dans ce groupe pour la forme du bec, depuis l'un dont le bec excède en dimensions celui du plus large gros-bec, jusqu'à celui dont le bec ne diffère que très peu du bec d'une fauvette ». Les différences de forme du bec reflètent des alimentations différentes et la façon dont les pinsons prélèvent leur nourriture. Plus tard Darwin commenta : « En voyant cette gradation et cette diversité de structures dans un petit groupe d'oiseaux très proches, on peut vraiment s'étonner qu'à partir de la pauvreté originelle en oiseaux de cet archipel, une espèce a permis de produire toute cette diversité ». La Figure 1 montre la grande variation dans la forme et la taille des becs des pinsons des Galapagos, qui résulte de l'adaptation à différentes sources de nourriture. Les dessins des spécimens ramenés par Darwin sont de l'ornithologiste anglais John Gould.

Des investigations récentes ont donné des indices concernant les caractéristiques du développement responsables de ces différences dans la forme des becs. Les espèces avec les becs les plus larges et profonds par rapport à leur longueur, montrent des taux plus élevés de BMP-4 dans la zone de croissance du bec que les espèces avec des becs longs et fins. La surexpression 1. Geoplas magnirentis. Benerata parrets.

Figure 1

de *Bmp4* dans le bec en développement d'un embryon de poulet conduit à la formation de becs plus larges et profonds qu'à la normale. Une analyse par puces à ADN, permettant d'identifier les ARNm exprimés de manière différentielle dans les becs de formes différentes des pinsons, a révélé l'implication d'une autre protéine dans l'établissement de la forme du bec. La protéine Calmoduline, qui se lie au calcium et est un élément important de la voie de transduction des signaux calcium-dépendants, est produite en plus grande quantité dans les becs longs et pointus, et sa surproduction chez l'embryon de poulet provoque un allongement de son bec. Nous avons ici un excellent exemple de variations des processus de développement qui produisent des différences de forme et de fonction sur lesquelles la sélection naturelle peut agir.

l'animal et dans la production de différences physiologiques entre espèces. Les modifications des régions régulatrices des gènes qui altèrent le taux d'expression et son contrôle spatio-temporel, sont particulièrement importantes pour l'évolution des animaux. Beaucoup de gènes du développement ont acquis un grand nombre d'éléments régulateurs distincts pendant leur histoire évolutive, chacun contrôlant l'expression du gène dans des profils spatiaux différents à divers moments du développement (Sections 2.22 et 8.1). Il est dès lors simple de comprendre comment des mutations dans les régions régulatrices, en changeant quand et où le gène est exprimé, peuvent représenter une force majeure pour les changements évolutifs.

Les animaux (métazoaires), qui dérivent tous d'un ancêtre commun (Fig. 14.2), sont traditionnellement subdivisés en trois grands groupes selon la structure de base de leur corps : les bilatériens qui ont une symétrie bilatérale ; les cnidaires et cténophores de symétrie radiaire ; et les « parazoaires » (éponges et placozoaires) dépourvus de symétrie et plus simples d'un point de vue de l'organisation du corps et de la différenciation cellulaire. Les cnidaires et bilatériens sont généralement considérés comme des groupes-frères, c'est-à-dire qu'ils partagent un ancêtre commun qui leur est propre. Les relations de parenté avec les autres groupes (placozoaires, cténophores et éponges), et celles de ces derniers entre eux, sont encore très débattues.

Le plus grand groupe d'animaux actuels est celui des bilatériens. Ces derniers possèdent une symétrie bilatérale au moins à certains stades de leur développement et ont des profils d'expression caractéristiques des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur. Les bilatériens incluent les chordés (parmi lesquels on retrouve les vertébrés), les échinodermes (dont les adultes présentent néanmoins une symétrie radiaire), les arthropodes, les annélides,



Fig. 14.2 Un arbre phylogénétique des métazoaires. Cet arbre est basé sur des données moléculaires (ADN ribosomaux et séquences des gènes Hox) et génomiques. La position d'*Urbilateria*, le dernier ancêtre commun de tous les bilatériens, est indiquée par un cercle rouge.

les mollusques et les nématodes. Ces animaux sont dits **triploblastiques :** ils ont trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). Les cnidaires (coraux, méduses, hydres et apparentés) et les cténophores (par exemple, la groseille de mer et la ceinture de Vénus) sont des organismes **diploblastiques** : leur symétrie est généralement radiaire et ils ne possèdent que deux feuillets (endoderme et ectoderme). Certains cnidaires, comme *Nematostella*, ont une symétrie bilatérale et l'étude de l'expression des gènes Hox chez cette espèce a conduit certains chercheurs à suggérer que le dernier ancêtre commun des cnidaires et bilatériens a eu une symétrie bilatérale.

Tout au long de ce livre, il a été mis en évidence la conservation, aux niveaux moléculaires et cellulaires, de certains mécanismes du développement entre espèces parfois très éloignées. L'utilisation chez de nombreux animaux des gènes Hox ou de certaines familles de protéines de signalisation en est un bon exemple. Ce sont ces similitudes dans les mécanismes moléculaires qui ont rendu la biologie du développement aussi excitante ces dernières années, car elles signifient que la découverte d'un gène chez une espèce peut avoir des implications pour la compréhension du développement d'autres espèces. Il semble que quand un mécanisme de développement utile est établi, il est maintenu et redéployé dans des organismes très différents, ainsi qu'à différents moments ou endroits du même organisme.

Dans les autres chapitres du livre, le développement précoce d'une série d'espèces différentes a été abordé et certaines similitudes et aussi de nombreuses différences ont été trouvées. Dans ce chapitre, deux principaux phyla, les chordés (incluant les vertébrés) et les arthropodes (notamment les insectes et les crustacés) seront étudiés. Les différences qui distinguent les membres de ces deux groupes seront examinées. La relation entre le développement de l'organisme individuel (son ontogenèse) et l'histoire évolutive de l'espèce ou groupes d'espèces (la phylogénie) sera également examinée. Comment expliquer, par exemple, que les embryons de mammifères passent par un stade ressemblant à un poisson avec des structures de type branchies ? Les variations existantes du plan d'organisation segmenté retrouvé chez les arthropodes seront abordées. Qu'est-ce qui détermine la variété en nombre et position des appendices, comme les ailes et les pattes, dans les différents groupes d'arthropodes ? Les variations dans la vitesse, la durée et la chronologie du développement et de la croissance et les effets majeurs qu'elles peuvent avoir sur la morphologie des organismes, seront également examinées. Dans tous les cas, l'objectif ultime est de comprendre les changements du développement et leur base génétique, qui ont conduit à l'extraordinaire diversité des animaux. C'est un domaine de recherche très excitant où de nombreux problèmes restent à résoudre. Dans un premier temps, sera abordé comment le développement a lui-même évolué. Quelle est l'origine de l'œuf et comment des mécanismes, comme la gastrulation, ont-ils évolué ?

L'évolution du développement

Étudier les origines du développement requiert de considérer d'abord ce que nous savons des ancêtres des animaux actuels. Des études génomiques ont suggéré que le dernier ancêtre commun des bilatériens, appelé *Urbilateria*, était probablement une créature complexe qui possédait tous les réseaux de gènes du développement utilisés par les bilatériens actuels. À quoi *Urbilateria* ressemblait-il et quel était son développement, sont des questions clés abordées dans le domaine de l'évo-dévo. Une autre question fondamentale est de comprendre comment les réseaux génétiques conservés déjà présents chez les ancêtres des animaux, comme *Urbilateria*, ont été modifiés de manière à générer la diversité extraordinaire des animaux actuels.

14.1 Des études génomiques nous éclairent sur l'origine des métazoaires

Il existe environ 35 phyla différents d'animaux actuels et 30 d'entre eux sont des bilatériens. Ce groupe est traditionnellement subdivisé en protostomiens et
deutérostomiens, en relation avec l'origine de la bouche pendant la gastrulation. Chez les protostomiens, la bouche se forme pendant la gastrulation, à proximité de l'endoderme et du mésoderme qui s'invaginent. Les protostomiens ont une chaîne nerveuse ventrale dans le tronc qui est connectée à des ganglions dorsaux dans la tête (formant le « cerveau » de l'animal) *via* des connectifs qui s'étendent de part et d'autre du tube digestif antérieur. Les arthropodes, comme la drosophile (Chapitre 2) et les nématodes, comme *Caenorhabditis* (Chapitre 6), sont des protostomiens.

Chez les deutérostomiens, la bouche se développe indépendamment de la gastrulation qui définit l'anus, et le système nerveux central se forme dorsalement dans l'animal. Les deutérostomiens incluent les chordés, notamment les vertébrés (Chapitres 3 à 5) et les ascidies (voir compléments en ligne), ainsi que les échinodermes (Chapitre 6).

D'après les fossiles connus, les premiers bilatériens adultes seraient apparus pendant le Cambrien précoce, il y a environ 540 millions d'années, ou peut-être même plus tôt, lors d'une période appelée « explosion cambrienne » pendant laquelle une énorme diversité d'animaux est apparue. Des fossiles de cette période révèlent l'existence d'animaux segmentés avec une symétrie bilatérale et une tête bien différenciée.

Les animaux non bilatériens, qui appartiennent pour la plupart au phyla des cnidaires, cténophores et éponges, sont plus anciens et considérés comme plus simples que les bilatériens. Le génome d'espèces appartenant à chacun de ces groupes a été séquencé : les cnidaires *Hydra magnipapillata* et *Nematostella vectensis* (anémone de mer), l'éponge *Amphimedon queenslandica*, le placozoaire *Trichoplax adhaerens* et le cténophore *Pleurobrachia bachei*. Ces données génomiques ont permis de compléter notre connaissance de l'évolution de certains gènes du développement très importants, comme les gènes Hox et les gènes codant les éléments des principales voies de signalisation, comme les voies Wnt et Hedgehog. Ces études ont révélé que les répertoires de protéines caractéristiques des différents types de cellules animales sont apparus très tôt dans l'évolution des animaux. Des exemples de protéines de signalisation retrouvées chez les bilatériens et les non-bilatériens, sont indiqués dans la Fig. 14.3.

Le génome de *Nematostella* révèle un répertoire complexe de gènes, plus similaire à celui des vertébrés qu'à ceux des mouches ou des nématodes, indiquant que le génome du dernier ancêtre commun des cnidaires et des bilatériens était de complexité similaire. Près d'un cinquième des gènes prédits dans le génome de *Nematostella* n'est pas retrouvé dans d'autres groupes d'animaux et ce génome est riche en gènes codant des protéines impliquées dans les communications entre cellules, l'adhérence cellulaire et la transmission synaptique.

En prenant en compte l'ensemble des données disponibles concernant les bilatériens et les cnidaires, nous pouvons poser l'hypothèse que le dernier ancêtre commun de ces animaux a vécu il y a environ 700 millions d'années et possédait des spermatozoïdes flagellés, une phase de gastrulation pendant son développement, plusieurs feuillets embryonnaires, de vrais épithéliums avec une lame basale, un tube digestif, des systèmes neuromusculaires et sensoriels, et des axes de symétrie du corps fixes. Le génome de *Nematostella* contient environ 18 000 gènes codant des protéines, un nombre similaire à celui de *Caenorhabditis*. Des représentants de 56 familles de gènes codant des facteurs de transcription à homéodomaine, dont trois gènes Hox et des membres de quatre classes de gènes Pax, sont présents chez *Nematostella*. De façon remarquable pour un animal qui ne possède que deux feuillets embryonnaires, des homologues d'au moins sept gènes associés à la formation du mésoderme chez les bilatériens, sont exprimés dans l'endoderme en développement de *Nematostella*. La machinerie permettant la mise en place des feuillets embryonnaires était donc déjà présente chez l'ancêtre des bilatériens et des cnidaires.

Les éponges diffèrent beaucoup des bilatériens et des cnidaires en ce qui concerne la morphologie. Elles n'ont que peu de types cellulaires, certains sensoriels et d'autres digestifs, mais elles partagent beaucoup de caractéristiques moléculaires avec les autres groupes d'animaux, par exemple la présence de molécules de signalisation (Notch, Wnt et Nodal ; Fig. 14.3), des gènes à homéoboîte (mais pas de gènes Hox)

	Wnt	Notch	Nodal	BMP	hh
Éponges					
Placozoaires					
Cténophores					
Cnidaires					
Bilatériens					

Fig. 14.3 Les molécules de signalisation présentes dans les différents groupes d'animaux. Présence des principales voies de signalisation dans chaque phylum en se basant sur la séquence du génome d'espèces appartenant à ces phyla.

et des cellules avec des caractéristiques neurales. Tout cela suggère que le dernier ancêtre commun de tous les animaux avait au moins certains des types cellulaires et des molécules retrouvés chez la plupart des animaux actuels.

Il y a un animal marin non parasite appelé *Trichoplax*, qui forme un phylum à part entière, les placozoaires. Ses relations de parenté avec les autres phyla ne sont pas clairement connues, mais des comparaisons génomiques indiquent qu'il fait partie d'une lignée de métazoaires très simples. *Trichoplax* est composé de deux couches épithéliales formant un disque plat dépourvu de tube digestif. Seuls quatre types cellulaires sont reconnus. Cet animal se reproduit principalement par fission. Son génome contient néanmoins près de 11 500 gènes codant des protéines, notamment un riche répertoire de gènes codant des facteurs de transcription (gènes à homéoboîte, gène à boîte T...) et de gènes codant des éléments de voies de signalisation (par exemple la voie Wnt/β-caténine).

14.2 Les animaux ont évolué à partir d'ancêtres unicellulaires

Les animaux ont évolué à partir d'un ancêtre unicellulaire qui, notamment d'après certaines données génomiques, aurait été un organisme relativement similaire aux choanoflagellés actuels. Ces derniers sont des unicellulaires, qui peuvent être libres ou coloniaux, caractérisés par la présence d'un flagelle entouré d'une collerette de villosités et présentent une morphologie similaire à celle d'un des types cellulaires caractéristiques des éponges, les choanocytes. Quelles sont les innovations évolutives qui ont été requises pour la transition vers la multicellularité ? Et comment le développement embryonnaire à partir d'un œuf a-t-il été mis en place ? Les éléments requis pour le développement embryonnaire sont un programme d'activité génique, la différenciation cellulaire, la transduction de signaux (pour que les cellules puissent communiquer entre elles), et la cohésion et la mobilité des cellules (afin que la forme globale puisse changer).

En considérant les caractéristiques d'eucaryotes unicellulaires actuels comme les choanoflagellés, l'ancêtre unicellulaire des animaux possédait sans doute toutes ces propriétés sous une forme primitive et peu de choses vraiment nouvelles ont dû être inventées, même si elles ont dû être profondément modifiées pour que la multicellularité puisse apparaître. La séquence du génome du choanoflagellé *Monosiga brevicollis* montre l'existence chez cette espèce de molécules d'adhérence et de signalisation retrouvées par ailleurs que chez les métazoaires. Les eucaryotes unicellulaires ont la capacité de se mouvoir, d'adhérer et de répondre à des signaux. Au minimum, l'ancêtre des animaux possédait probablement le cycle cellulaire caractéristique des eucaryotes comportant un programme complexe d'activités géniques, la capacité d'entamer une différenciation cellulaire, une signalisation *via* des récepteurs à tyrosine kinase et une adhérence cellulaire nécessitant des cadhérines.

Quelle a donc été l'origine de la multicellularité et des embryons ? Une possibilité, très spéculative, est que des mutations ont pu provoquer la non-séparation des cellules filles d'un organisme unicellulaire après la division cellulaire, conduisant à la formation de colonies de cellules identiques pouvant occasionnellement se fragmenter pour donner de nouveaux individus. Un avantage d'une colonie pourrait avoir originellement été que, si la nourriture était limitée, les cellules pouvaient se nourrir les unes des autres, permettant ainsi la survie de la colonie. Ceci a pu être à l'origine à la fois de la multicellularité et de l'existence de la mort cellulaire chez les organismes multicellulaires. L'œuf pourrait avoir ensuite évolué comme la cellule nourrie par les autres cellules. Chez les éponges, par exemple, l'œuf phagocyte les cellules qui l'entourent. L'avantage évolutif d'un organisme se développant à partir d'une seule cellule est que toutes ses cellules ont les mêmes gènes. C'est un pré-requis pour le développement de plans d'organisation complexes car cela nécessite des communications cellulaires et ne peut être fiable que si les cellules obéissent aux mêmes règles car elles ont les mêmes instructions génétiques. Certains organismes « multicellulaires » se développent à partir de plusieurs cellules, comme les amibes sociales, mais ces organismes n'ont jamais évolué en de nombreuses formes complexes.



Une fois la multicellularité acquise, elle ouvre de nombreuses nouvelles possibilités, telle que la spécialisation des cellules pour différentes fonctions. Certaines cellules peuvent par exemple se spécialiser dans la motilité et d'autres dans la nutrition, comme les nématocytes, les cellules urticantes de *Hydra*, qui servent à capturer la nourriture. L'origine des mécanismes qui assurent que la différenciation cellulaire se fait de manière spatialement organisée, n'est pas connue, mais aurait pu dépendre de gradients mis en place par des influences extérieures.

Comment la gastrulation a-t-elle été établie est également une question non résolue. On peut considérer un scénario dans lequel une sphère creuse de cellules, l'ancêtre commun de tous les animaux, aurait pu modifier sa forme pour aider à sa nutrition (Fig. 14.4) et, par exemple, reposer sur le fond des océans et ingérer des particules alimentaires par phagocytose. Une petite invagination de la paroi du corps aurait pu faciliter la nutrition en formant un tube digestif primitif, avec des mouvements de cils dirigeant les particules alimentaires plus efficacement vers cette région où elles auraient été phagocytées. Une fois cette invagination formée, il n'est pas difficile d'imaginer comment elle se serait étendue et aurait formé un tube digestif continu entouré d'endoderme. Plus tard, au cours de l'évolution, des cellules migrant à l'intérieur du corps auraient pu produire le mésoderme.

La gastrulation constitue un bon exemple de changement du développement au cours de l'évolution. Quoiqu'il y ait beaucoup de similitudes dans ce processus chez de nombreux animaux, il y a aussi de nombreuses différences comme cela est discuté tout au long de ce livre. Comment cela a-t-il été mis en place et quelle a pu être la nature adaptative des formes intermédiaires, sont des questions non résolues.

RÉSUMÉ

L'embryon est apparu pendant l'évolution animale à partir d'ancêtres unicellulaires qui avaient la plupart des propriétés requises pour le développement embryonnaire. Une fois acquise, la multicellularité pourrait avoir persisté à l'origine, car une colonie de cellules pouvait fournir une source de nourriture pour certains de ses membres en cas de disette. L'œuf pourrait avoir évolué comme une cellule nourrie par les autres cellules et avoir fourni la base pour le développement de structures complexes. Le développement de l'embryon éclaire l'origine évolutive des animaux.

Les modifications évolutives du développement embryonnaire

La comparaison d'embryons d'espèces proches suggère une importante généralisation à propos du développement : les caractéristiques partagées par tous les membres d'un groupe d'animaux apparaissent habituellement plus tôt dans le développement et au cours de l'évolution que les caractéristiques plus spécifiques. Chez les vertébrés, un bon exemple d'une caractéristique générale est la chorde, commune à tous les vertébrés, mais aussi retrouvées chez les chordés non vertébrés. Le phylum des chordés comprend en effet trois grands groupes, les vertébrés, les céphalochordés comme l'amphioxus *Branchiostoma* (Fig. 14.5) et les urochordés, en particulier les ascidies (voir compléments en ligne). Ils possèdent tous, à un stade de leur développement, une chorde flanquée par des muscles et un tube neural dorsal. Les céphalochordés

Fig. 14.4 Un scénario possible pour le développement de la gastrula. Une sphère creuse de cellules, peut-être dérivant d'une colonie d'organismes unicellulaires, se serait posée sur le fond de l'océan et aurait développé une invagination qui aurait aidé à la digestion.

D'après Jaegerstern G. : **The early phylogeny** of the metazoa. The bilatero-gastrea theory. Zool. Bidrag. (Uppsala) 1956, **30** : 321-354.

Fig. 14.5 Le céphalochordé Amphioxus comparé à un vertébré ancestral

hypothétique ressemblant aux lamproies actuelles. La construction générale des deux animaux est très similaire, avec un tube neural dorsal, une chorde axiale dorsale et un tube digestif ventral. Les deux animaux ont des branchies dans leur région pharyngienne, structures servant à la capture de la nourriture et au prélèvement de l'oxygène présent dans l'eau. La chorde s'étend jusqu'à l'extrémité antérieure de l'amphioxus. Le vertébré a une tête proéminente située antérieurement par rapport à la chorde. Chez la plupart des vertébrés, la chorde n'est présente que pendant le développement et est remplacée par la colonne vertébrale.

Modifié d'après Finnerty J. R. : **Evolutionary** developmental biology : Head start. Nature, 2000, **408** : 6814.



retiennent ces caractéristiques générales des chordés à l'état adulte, ce qui n'est pas le cas des vertébrés chez qui la chorde est remplacée par une colonne vertébrale.

Parmi les chordés, la présence d'appendices pairs, comme des membres, est une caractéristique spécifique des vertébrés, mais ces appendices diffèrent au sein de ces derniers. Tous les embryons de vertébrés passent par un stade phylotypique pendant lequel ils se ressemblent plus ou moins et montrent les caractéristiques embryonnaires du phylum auquel ils appartiennent (Fig. 3.2). Après le stade phylotypique, les embryons de vertébrés se diversifient et acquièrent les différentes formes caractéristiques des diverses classes de vertébrés. Le stade phylotypique est lui-même quelque peu variable (Fig. 14.6), le nombre de somites pouvant être très différent et certains organes, comme les membres, pouvant être à différents stades de leur développement. Le développement des divers groupes de vertébrés avant le stade phylotypique varie aussi beaucoup, en relation avec leurs différents modes de reproduction. Certaines caractéristiques du développement précoce peuvent être uniques à un groupe de vertébrés, comme la formation du trophoblaste et de la masse cellulaire interne chez les mammifères. C'est un exemple d'un caractère apparu tard dans l'évolution des vertébrés et qui est lié à la nutrition de l'embryon via un placenta et non pas grâce à du vitellus présent dans l'œuf.

La raison qui fait que les embryons de vertébrés passent par un stade phylotypique est encore un objet de débat. Cela peut être lié au fait que c'est à ce stade que les gènes Hox sont exprimés. C'est également le stade pendant lequel les structures communes à tous les vertébrés, somites, chorde et tube neural, sont formées. Les changements qu'ont subis plusieurs structures embryonnaires au cours de l'évolution, incluant les membres et le plan d'organisation général du corps, vont être considérés dans la suite de ce chapitre.

14.3 Les complexes de gènes Hox ont évolué par duplications géniques

Les gènes Hox jouent des rôles importants pendant le développement de la plupart des animaux, incluant les vertébrés et les insectes. La comparaison de l'organisation et de la structure des gènes Hox dans ces deux groupes permet de déterminer comment un ensemble de gènes du développement très importants a été modifié au cours de l'évolution. Un mécanisme majeur à l'origine des changements évolutifs est la duplication de gènes suivie de leur divergence. La duplication en tandem d'un gène, qui peut être produite par divers mécanismes, fournit à l'embryon une copie additionnelle du gène. Dès lors, la séquence nucléotidique de cette copie va pouvoir diverger de l'autre séquence, tant dans sa région codante que dans son promoteur ou ses éléments *cis*-régulateurs, modifiant ainsi sa fonction et/ou son profil d'expression, sans pour autant priver l'organisme de la fonction du gène originel (Fig. 14.7). Les duplications géniques ont été essentielles pour l'évolution de nouvelles protéines ou Fig. 14.6 Les embryons des vertébrés au stade phylotypique montrent des variations considérables du nombre de somites. Les dessins ne sont pas à l'échelle.

Modifié d'après Richardson M. K. et al. : There is no highly conserved embryonic stage in the vertebrates : implications for current theories of evolution and development. Anat. Embryol. 1997, **196** : 91-106.

de nouveaux profils d'expression. Il est clair, par exemple, que les différentes hémoglobines présentes dans l'espèce humaine (Fig. 8.17) proviennent de duplications géniques. Dans le cas de gènes codant des facteurs de transcription, des altérations de leur région codante peuvent modifier la structure et les propriétés de fixation de la protéine codée, ce qui peut conduire à des modifications du répertoire des gènes cibles régulés.

Les gènes Hox fournissent un des exemples les plus clairs de l'importance des duplications géniques dans l'évolution du développement. Ces gènes contrôlent l'identité de nombreuses structures le long de l'axe antéro-postérieur et sont parmi les gènes les plus caractéristiques des animaux. Ils font partie de la superfamille des gènes à homéoboîte qui codent des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'un motif hélice-tour-hélice de liaison à l'ADN, l'homéodomaine, d'environ 60 acides aminés (Encart 5E). Deux propriétés caractérisent les gènes Hox de nombreux bilatériens : ces gènes sont organisés en un ou plusieurs complexes et l'ordre d'expression de ces gènes le long de l'axe antéro-postérieur est généralement le même que l'ordre séquentiel des gènes dans le complexe (colinéarité ; voir Section 5.10).

Les complexes Hox les plus simples sont retrouvés chez certains non vertébrés et comprennent un petit nombre de gènes Hox portés par un seul chromosome. Les vertébrés, en revanche, possèdent typiquement quatre complexes Hox, qui auraient été produits, selon un modèle très généralement accepté, lors de deux duplications complètes du génome qui seraient survenues au cours de l'évolution des vertébrés. Il y a aussi eu des duplications géniques au sein des complexes. Une duplication totale du génome serait également survenue chez un ancêtre des « poissons » actuels, avec pour résultat la présence de sept complexes chez le poisson-zèbre et chez le poisson-globe japonais *Takifugu rubripes* (la duplication aurait été suivie de la perte d'un des complexes). Il semble que chez l'ancêtre des chordés, la colinéarité spatiale entre l'ordre des gènes Hox sur le chromosome et leurs expressions le long de l'axe antéro-postérieur, ne concernait que le tube neural et peut-être l'épiderme. Cette colinéarité aurait été plus tard étendue à d'autres tissus, permettant un accroissement de la complexité du plan d'organisation du corps.

La comparaison des gènes Hox dans différentes espèces d'arthropodes et de vertébrés indique que leur dernier ancêtre commun, *Urbilateria*, possédait sans doute un seul complexe Hox contenant sept gènes (Fig. 14.8). Plus proche des vertébrés, l'amphioxus, un céphalochordé, a lui aussi un seul complexe contenant 15 gènes et il est vraisemblable que ce complexe ressemble au complexe ancestral qui a généré les

Fig. 14.7 Duplication et divergence génique. Une fois qu'un gène a été dupliqué, la seconde copie peut générer de nouvelles fonctions et/ou de nouveaux profils d'expression. Un exemple hypothétique d'un gène (en violet, la région codante) avec deux éléments régulateurs (en bleu et vert) conférant une expression dans deux tissus différents, est illustré ici. À gauche : après la duplication complète du gène, y compris ses régions régulatrices, des mutations dans la région codante peuvent conduire ce gène à exercer de nouvelles et utiles fonctions qui peuvent être positivement sélectionnées. Les deux copies sont toutes les deux maintenues car elles exercent des fonctions utiles. Des mutations subséquentes dans les régions régulatrices peuvent conduire à de nouveaux profils d'expression. À droite : alternativement, une mutation dans un des éléments régulateurs d'une des deux copies du gène et une mutation dans l'autre élément régulateur de l'autre gène peuvent faire que les deux gènes exercent collectivement la fonction ancestrale (et sont donc tous les deux nécessaires), chacun n'étant exprimé que dans un des deux tissus. Des exemples de ce type de duplication et de divergence ont été observés dans des génomes d'animaux.





Fig. 14.8 Évolution des gènes Hox par duplication génique. Les relations de parenté entre les gènes Hox d'un ancêtre hypothétique et ceux de la drosophile (arthropode), de l'amphioxus (céphalochordé) et de la souris (vertébré) sont montrées. Des duplications géniques des gènes ancestraux (en rouge) ont donné naissance à des gènes additionnels chez la drosophile et l'amphioxus. Deux duplications des complexes entiers chez un ancêtre des vertébrés actuels ont produit les quatre complexes Hox retrouvés chez ceux-ci. Il y a également eu des pertes de certains gènes chez les vertébrés. Chez la drosophile, le complexe Hox s'est coupé en deux, suite à un réarrangement chromosomique et a donné naissance aux complexes Antennapedia et bithorax. Le gène Hox14 est retrouvé chez l'amphioxus, le cœlacanthe et le requin dormeur cornu. Le gène Hox15 n'a été retrouvé jusqu'à présent que chez l'amphioxus et n'a pas de relation de parenté claire avec les autres groupes de paralogie.



quatre complexes Hoxa, Hoxb, Hoxc et Hoxd retrouvés chez les vertébrés (Fig. 14.8). Des scénarios ont été élaborés pour rendre compte de l'évolution par duplication génique depuis un complexe ancestral vers les complexes observés chez les vertébrés et la drosophile. Chez cette dernière, par exemple, des duplications en tandem successives d'un gène ancestral de type *Antennapedia* (*Antp*) auraient produit les gènes *abdominal-A* (*abd-A*), *Ultrabithorax* (*Ubx*) et *Antp* (Fig. 14.8). *Antp* est associé à la spécification du second segment thoracique (T2) et, si les gènes du complexe bithorax (*Ubx, abd-A* et *Abd-B*), exprimés plus postérieurement dans l'embryon, sont éliminés chez la drosophile, tous les segments postérieurs à T2 (thoraciques et abdominaux) sont convertis en segments T2 et expriment *Antp* (Fig. 2.51).

Chez les vertébrés, les gènes Hox sont répartis en quatre complexes séparés, situés sur des chromosomes distincts. Ces différents complexes proviennent de duplications du génome, mais au sein de ces complexes des duplications en tandem ont également donné naissance à de nouveaux gènes. Ainsi des comparaisons de séquences suggèrent que les multiples gènes Hox de la souris qui sont très similaires en séquence au gène *Abd-B* de drosophile, n'ont pas d'homologues directs dans le complexe de la drosophile (Fig. 14.8). Ces gènes proviennent très probablement de duplications en tandem d'un gène ancestral survenues après la séparation des lignées des vertébrés et des arthropodes, mais avant les duplications des complexes entiers chez les vertébrés. Le rôle des gènes Hox dans l'évolution du plan d'organisation du corps va maintenant être considéré.

14.4 Des modifications des gènes Hox et de leurs gènes cibles contribuent à la diversification des plans d'organisation des bilatériens

Les grandes similitudes dans les profils d'expression des gènes Hox chez les vertébrés et les arthropodes, qui ont divergé il y a plusieurs centaines de millions d'années, peuvent être considérées comme un argument en faveur de l'idée que tous les animaux dérivent d'un même ancêtre commun. Les gènes Hox sont des gènes importants pour le contrôle du développement et de la régionalisation du corps le long de l'axe antéro-postérieur (Chapitres 2 et 5). La conservation de l'expression des gènes Hox (et d'autres gènes du développement), a conduit au concept de zootype, un profil d'expression général de tous ces gènes clés qui est observé dans les embryons de tous les animaux.

L'organisation extrêmement conservée de l'expression des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur suggère que des changements des patrons d'expression peuvent avoir des conséquences importantes pour la morphologie de l'animal. Les gènes Hox exercent leur influence en contrôlant l'expression d'un grand nombre de gènes cibles qui déterminent, par exemple, comment les cellules d'une région donnée vont acquérir les propriétés morphologiques caractéristiques de cette région : la capacité de former des appendices spécifiques de certains segments, ailes et pattes par exemple, chez les arthropodes, ou différents types de vertèbres chez les vertébrés. Ces gènes cibles sont des gènes « effecteurs » qui interprètent l'information de position fournie par l'expression des gènes Hox.

Des mutations des gènes cibles des protéines Hox, en particulier celles qui affectent l'interprétation de l'information de position, sont donc probablement aussi des sources importantes de modifications morphologiques au cours de l'évolution. On ne connaît pour l'instant néanmoins qu'une partie des gènes cibles des protéines Hox.

Une modification aisément visualisable du plan d'organisation du corps, impliquant les gènes Hox et survenue pendant l'évolution des vertébrés, concerne le squelette axial, la colonne vertébrale et les côtes. L'organisation du squelette axial est caractérisée par le nombre et le type de vertèbres dans les principales régions du corps (vertèbres du cou, thoraciques portant des côtes, lombaires, sacrées et caudales ; Fig. 14.9). Le nombre de vertèbres de chacun de ces types varie beaucoup d'un groupe de vertébrés à l'autre : les mammifères, à quelques rares exceptions près, ont sept vertèbres cervicales, alors que les oiseaux en ont entre 13 et 15 et certains reptiles, comme les serpents, peuvent n'avoir aucune vertèbre cervicale mais plus de 200 vertèbres thoraciques.

Comment ces différences ont-elles été mises en place ? Une comparaison entre la souris et le poulet a montré que les profils d'expression des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur diffèrent. La limite d'expression de *Hoxc6*, par exemple, un des gènes Hox dont il a été montré expérimentalement qu'il spécifie une identité thoracique, est au niveau du somite 12 chez la souris et du somite 19 chez le poulet (Fig. 5.30 ; les cinq premiers somites ne produisent pas de vertèbres). Chez les oies, qui ont trois vertèbres cervicales de plus que le poulet, la limite antérieure d'expression de *Hoxc6* est au niveau des somites 22-23. La majeure partie du corps des serpents consiste en un tronc très allongé et leur colonne vertébrale comporte un grand nombre de vertèbres thoraciques portant des côtes, comme on peut le voir dans la Fig. 14.10 dans le cas du python. Dans cette espèce, *Hoxc6* et *Hoxc8* sont exprimés dans tous les somites du tronc, suggérant que des altérations de l'expression des gènes Hox seraient impliquées dans l'évolution du plan d'organisation du corps du python.

Un exemple d'un changement dans l'expression d'un gène cible des gènes Hox, qui affecte la morphologie, a été retrouvé chez le serpent des blés (*Pantherophis guttatus*). Une analyse détaillée des domaines d'expression des gènes Hox dans cette espèce, montre qu'ils ne sont pas aussi homogènes que chez le python. Certains paralogues





Fig. 14.9 Les différents types de vertèbres. Vue latérale du squelette d'un embryon de souris au stade E18,5, coloré au bleu alcian pour le cartilage et à l'alizarine rouge pour les os, montrant la distribution des vertèbres dans les principales régions anatomiques du corps : cervicale 7 ; thoracique avec côtes 13 ; lombaire 6 ; sacrée 4 ; caudale environ 30 (toutes ne sont pas bien visibles sur ce spécimen). *Photographie reproduite avec l'aimable autorisation de D. M. Wellik, from Wellik, D.M. :* **Hox genes and vertebrate axial pattern.** Curr. Topics Dev. Biol. 2009, **88** : 257-278.

Fig. 14.10 Comparaison de l'expression des gènes Hox dans l'embryon de python et de poulet. La photographie montre le squelette d'un embryon de python après 24 jours d'incubation, coloré au Bleu Alcian et Rouge Alizarin. La flèche marque la position des membres postérieurs rudimentaires non visibles sur cette préparation. Noter la ressemblance de toutes les vertèbres du tronc situées antérieurement par rapport à la flèche. À droite, comparaison schématique des domaines d'expression des gènes Hoxb5 (en vert), Hoxc8 (en bleu) and Hoxc6 (en rouge) dans les embryons de poulet et de python. L'expansion des domaines d'expression de Hoxc8 et Hoxc6 est corrélée à l'expansion de l'identité thoracique au niveau du squelette axial et à celle du flanc dans le mésoderme des lames latérales.

D'après Cohn, M.J. and Tickle C. : Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. Nature 1999, 399 : 474-479. Hox10, Hoxa10 par exemple, qui spécifient les vertèbres lombaires chez la souris (Section 5.11), sont de manière surprenante exprimés dans les somites de la région postérieure du tronc du serpent des blés. Des expériences ont montré que la raison pour laquelle des vertèbres thoraciques se développent dans la partie postérieure du corps de ce serpent, n'est pas un changement de fonction de Hoxa10. Comme celui de la souris, Hoxa10 du serpent peut empêcher la formation de vertèbres thoraciques lorsqu'il est exprimé dans le mésoderme présomitique de la souris. Ce qui change chez le serpent des blés est l'interprétation qui est faite du code Hox. Un changement d'un seul nucléotide dans un enhancer d'un gène cible de Hoxa10 a été identifié chez ce serpent. Ce gène est requis pour la formation des côtes et, chez la souris, son expression est inhibée dans la région lombaire par Hoxa10. À cause de la mutation susmentionnée, chez le serpent des blés, Hoxa10 ne peut pas se lier à cet enhancer et réprimer l'expression du gène qui favorise la formation des côtes. Des côtes se forment donc même dans la région où Hoxal0 est présente. Un même changement génétique est retrouvé chez certains mammifères comme les éléphants qui ont également une cage thoracique allongée.

Chez les vertébrés, l'expression des gènes Hox spécifie aussi des différences de position le long de l'axe antéro-postérieur du mésoderme des lames latérales à partir duquel les membres se forment (Section 11.2). La perte des membres au cours de l'évolution est assez commune et le python illustre bien les changements du développement responsables de cette perte. Comme les autres serpents, ils n'ont pas de membres antérieurs, mais ils possèdent en revanche une paire de membres postérieurs rudimentaires. Dans le mésoderme des lames latérales des vertébrés à quatre membres, Hoxb5, Hoxc6 et Hoxc8 sont exprimés dans le tronc entre les régions qui vont former les membres, alors que, chez le python, ces gènes sont exprimés dans tout le tronc jusqu'au rudiment pelvien (Fig. 14.10). Chez le poulet, Hoxc8 peut réprimer l'activité d'un enhancer de Tbx5, qui contrôle l'expression de ce gène dans la région des lames latérales qui va former le membre antérieur. Tbx5 est essentiel au développement du membre antérieur (Section 11.2) et sa répression par Hoxc8, qui est présente beaucoup plus largement chez les serpents, pourrait être à l'origine de l'absence des membres antérieurs chez ces animaux. Des bourgeons de membre postérieur se forment chez le python, mais les signalisations associées à la crête apicale ectodermique et à la zone à activité polarisante, ne sont pas activées, ce qui mène à la formation d'un membre très rudimentaire.

14.5 Des différences d'expression des gènes Hox déterminent des variations du positionnement et du type d'appendices chez les arthropodes

Des changements dans les profils d'expression des gènes Hox aident également à expliquer l'évolution de la grande diversité des plans d'organisation retrouvée chez les arthropodes et illustrée par la Fig. 14.11. On retrouve un corps segmenté (métamérisé) chez tous les embryons d'arthropodes, même si dans certaines classes comme les araignées, l'organisation segmentaire n'est plus très visible chez l'adulte. La détermination des homologies entre les différents types de métamères ou segments, terme qui sera utilisé ici, des différents groupes d'arthropodes n'est pas aisée si l'on se base uniquement sur des données anatomiques.

Ici ne seront uniquement considérés que les insectes et les crustacés dont l'étude a permis de fournir l'essentiel des données connues concernant les profils d'expression des gènes Hox. Les insectes et les crustacés dérivent d'un ancêtre dont les adultes avaient probablement un corps composé de segments plus ou moins uniformes portant tous des appendices pairs de type patte (Fig. 14.12). Au cours de l'évolution, la formation de pattes s'est restreinte à certains segments. L'étude des différences de types et de distributions des appendices pairs le long du corps des crustacés s'est avérée un bon modèle pour comprendre le rôle des gènes Hox dans l'évolution des plans d'organisation du corps des arthropodes. Si le produit d'un gène Hox « instruit »



activement l'identité d'un segment, ou d'un groupe de segments contigus, en régulant l'expression de gènes cibles qui spécifient les propriétés de ce segment, alors la même modification dans la morphologie segmentaire dans plusieurs groupes devrait s'accompagner du même changement dans l'expression de ce gène Hox.

Les crustacés se prêtent particulièrement bien à ce genre d'études. Le nombre de segments thoraciques varie d'un groupe à l'autre, mais chaque segment porte une paire d'appendices soit locomoteurs (des pattes de différents types), soit spécialisés dans la nutrition (maxillipèdes servant à manipuler la nourriture). Le nombre de pattes et de maxillipèdes thoraciques varie d'un groupe à l'autre et l'étude des profils d'expression des gènes Hox montre une relation entre ces profils et l'identité des segments et des appendices qu'ils portent. La Fig. 14.13 illustre les quatre grands types de distribution des segments et appendices chez les malacostracés (qui ont huit segments thoraciques), en relation avec les profils d'expression du gène Hox *Ubx*. Les autres principaux groupes de crustacés soit possèdent des pattes sur tous Fig. 14.11 La diversité des plans d'organisation des arthropodes. Sont représentés ici des exemples des quatre principales classes d'arthropodes. Les segments (ou métamères) qui portent les maxillipèdes (mxp), les pattes (pat), les pléopodes (plé) et les ailes (ail) sont signalés. Les segments de la tête portent une variété d'appendices spécialisés, comme les antennes et les pièces buccales. An, antenne ; Ch, chélicère ; In, segment intercalaire ; Lb, labium ; Mn, mandibule ; Mx, maxille ; Oc, œil ; Pp, pédipalpe.



Fig. 14.12 Les insectes et les crustacés ont évolué à partir d'un ancêtre commun. D'après Abzhanov, A., Kaufman, T.C. : Crustacean (malacostracan) Hox genes and the evolution of the arthropod trunk. Development 2000, 127 : 2239-2249.



leurs segments thoraciques (les branchiopodes comme l'artémie), soit peuvent posséder des maxillipèdes (chez les maxillopodes). On retrouve de manière générale une corrélation entre la présence de maxillipèdes (à la place des pattes) sur un segment thoracique et l'absence d'expression d'*Ubx* dans le segment en question.

Cette corrélation suggère que l'absence d'expression d'*Ubx* est la cause de la présence des maxillipèdes. Pour le prouver, il faut néanmoins pouvoir altérer le profil d'expression d'*Ubx* dans une espèce donnée et analyser les effets de cette altération (Fig. 2.51 pour la drosophile). Ceci a été réalisé chez un malacostracé, l'amphipode *Parhyale* : la diminution de l'expression d'*Ubx* conduit à la formation de maxillipèdes à la place des pattes, alors que l'expression forcée du gène dans un segment thoracique dans lequel il n'est normalement pas exprimé, provoque le développement de pattes à la place des maxillipèdes (Fig. 14.14). Dans les deux types d'expériences, les transformations n'affectent que les trois premiers segments thoraciques et les appendices des autres segments sont normaux. Ainsi en l'absence d'expression d'*Ubx* dans tout le thorax, des maxillipèdes se forment sur les trois premiers segments et des pattes sur les segments suivants. Ceci reflète la distribution naturelle des maxillipèdes qui ne sont jamais retrouvés au-delà du segment T3 (Fig. 14.13). Ces résultats suggèrent donc que des changements du profil d'expression du gène *Ubx*, ont conduit à des changements morphologiques chez les crustacés.

Malgré la grande variété d'insectes actuels, leurs plans d'organisation de base sont beaucoup moins divers que ceux des crustacés. Tous les insectes adultes ont trois segments thoraciques portant chacun une paire de pattes. Les ailes, quand elles sont présentes, sont toujours sur les second et troisième segments thoraciques (uniquement sur le second chez les diptères). Les fossiles d'insectes montrent néanmoins une plus grande diversité : certains ont des pattes sur tous les segments, et d'autres uniquement dans la région thoracique. Le nombre de segments abdominaux portant des pattes varie, tout comme la taille et la forme des pattes. Les ailes sont apparues plus tard que les pattes dans l'évolution des insectes. Des appendices de type aile sont présents sur tous les segments thoraciques et abdominaux de certains fossiles, ou limités au thorax chez d'autres. Pour comprendre comment ces différentes distributions sont apparues au cours de l'évolution des insectes, nous allons comparer deux groupes d'insectes, les lépidoptères (papillons) et les diptères (mouches et moustiques).

Les profils d'expression des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur sont très similaires chez tous les insectes actuels qui ont été étudiés. Chez les lépidoptères, les larves (chenilles) ont néanmoins de petites pattes locomotrices sur leur abdomen (fausses pattes) et les adultes ont deux paires d'ailes, alors que chez les diptères, il n'y a jamais de pattes abdominales et il n'y a qu'une paire d'ailes chez l'adulte, la seconde paire étant remplacée par des organes d'équilibration, les haltères. Ces différences morphologiques sont-elles liées à des différences d'expression des gènes Hox ?

Chez la drosophile, le gène *Distal-less*, qui est requis pour la formation des pattes (Section 11.24) est une cible des gènes Hox du complexe bithorax exprimés dans

Fig. 14.13 La présence et la position des maxillipèdes dans différentes espèces de crustacés dépendent de changements des profils d'expression des gènes *Ubx* et *abdA* au cours de l'évolution. Quatre exemples chez les malacostracés sont montrés, car cette classe présente la plus grande diversité au sein des crustacés. Le nombre et la position des maxillipèdes (en bleu) dans les segments thoraciques varient dans les différents ordres (par exemple décapodes et amphipodes) et leur présence est corrélée avec la limite antérieure d'expression des gènes *Ubx* et *abdA*. Un anticorps monoclonal qui reconnaît les deux protéines a été utilisé pour marquer des stades larvaires des différentes espèces. En rouge les régions où les deux protéines sont en grande quantité et qui présentent des pattes marcheuses ; en orange les régions avec une faible quantité de protéines et où se forment des pinces. Les maxillipèdes se forment dans les segments où les protéines Ubx et AbdA ne sont pas présentes.

D'après Averof, M., Patel, N.H. : Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression. Nature 1997, **388** : 682-685.

Fig. 14.14 Manipulation de l'expression du gène Ubx chez l'amphipode Parhyale

hawaiensis. Les individus sauvages (en haut) possèdent une seule paire de maxillipèdes sur le premier segment thoracique, des pinces sur les deux suivants et des pattes marcheuses sur les cinq autres (seuls les segments 1 à 4 sont représentés). Quand l'expression de *Ubx* est réduite dans l'embryon par l'injection de petits ARN interférents (siRNA ; Encart 6B), des maxillipèdes se forment sur les trois premiers segments thoraciques (au milieu). Quand *Ubx* est exprimé de manière ectopique dans tout le thorax d'animaux transgéniques, grâce à un promoteur de choc thermique, des pattes du type de celles retrouvées sur 72 se forment en T1 à la place des maxillipèdes, reflétant une transformation de ce dernier en un segment plus postérieur. À cause de la létalité induite par l'expression uniforme du gène *Ubx*, le gène a été exprimé pendant une courte période de temps chaque jour. Le résultat représenté ici a été observé dans environ 10 % des individus ayant éclos. Dans 3 % des cas, des pattes de type T4 se forment sur tous les segments thoraciques. Comme dans la Fig. 14.13 une forte expression d'*Ubx* est représentée en rouge et les différentes teintes d'orange correspondent à des taux d'expression plus faibles.

Données d'après Liubicich, D.M. et al. : Knockdown of Parhyale Ultrabithorax recapitulates evolutionary changes in crustacean appendage morphology. Proc. Natl Acad. Sci USA 2009, 106 : 13892-13896; Pavlopoulos, A. et al. : Probing the evolution of appendage specialization by Hox gene misexpression in an emerging model crustacean. Proc. Natl Acad. Sci USA 2009, 106 : 13897-13902.

l'abdomen. Ces protéines Hox répriment l'expression de *Distal-less* dans l'abdomen et donc la formation de pattes.

Si l'ensemble du complexe bithorax est éliminé, tous les segments abdominaux de l'embryon portent des disques de patte et d'aile (cette délétion est létale et il n'y a pas formation de larves). Cela suggère que tous les segments des insectes, mêmes ceux des diptères, ont la capacité de former des pattes et que cette capacité est activement réprimée dans l'abdomen de la drosophile, ce qui est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle les insectes ont évolué à partir d'un ancêtre formant des appendices sur tous ses segments (Fig. 14.12).

Pendant l'embryogenèse des lépidoptères, les gènes *Ubx* et *abd-A* (deux gènes du complexe bithorax) cessent d'être exprimés dans des petites régions ventrales des segments abdominaux. Ceci conduit à l'expression de *Distal-less* dans ces régions et à la formation de fausses pattes sur l'abdomen de la chenille. La présence ou l'absence de pattes sur l'abdomen dépend donc de l'expression ou de la non-expression de certains gènes Hox, ce qui conforte l'hypothèse d'un rôle important des gènes Hox dans l'évolution.

Il semble néanmoins probable que des changements dans les gènes cibles des gènes Hox puissent être encore plus importants pour l'évolution de nouveaux plans d'organisation du corps. Les gènes du complexe bithorax répriment la formation des membres dans l'abdomen des insectes, mais chez les crustacés ils sont exprimés dans le thorax (Fig. 14.13) et l'abdomen où se forment des appendices. Il doit donc y avoir des différences au niveau des gènes régulés par les gènes du complexe bithorax chez les insectes et les crustacés.

Si l'homéodomaine (le domaine de fixation à l'ADN) des protéines Hox est très conservé, il y a une considérable variation de la séquence du reste de ces protéines. Ces différences peuvent affecter la spécificité de liaison des protéines Hox à l'ADN, ainsi que leurs interactions avec d'autres protéines et donc aussi le nombre et l'identité des gènes dont ils vont réguler l'expression.

Des changements évolutifs dans les cibles des gènes Hox permettent d'expliquer pourquoi les mouches ont deux ailes alors que les papillons en ont quatre. Chez la drosophile, l'expression d'*Ubx* dans le troisième segment thoracique (T3) contrôle la formation d'une haltère à la place de l'aile qui se forme dans le segment adjacent (T2) dans lequel *Ubx* ne s'exprime pas au moment où l'aile est spécifiée (Sections 2.29 et 11.26). L'expression de nombreux gènes impliqués dans la formation de l'aile est réprimée par Ubx et ces gènes ne sont donc pas exprimés dans le segment T3. Chez le papillon, à cause de différences dans leurs régions régulatrices, l'expression de







Fig. 14.15 L'axe dorso-ventral des vertébrés et celui de la drosophile sont homologues mais inversés. À gauche : chez les arthropodes, la chaîne nerveuse est ventrale alors que chez les vertébrés elle est dorsale. Dorsal et ventral sont définis par la position de la bouche. À droite : chez les arthropodes, illustrés ici par la drosophile (coupe transversale de l'embryon au stade blastoderme) et les vertébrés, ici le xénope (vue superficielle de la blastula), les signaux spécifiant l'axe dorso-ventral sont les mêmes, mais sont produits de manière inversée. La protéine Chordin qui spécifie la région dorsale chez les vertébrés est l'homologue de Sog qui est ventral chez la drosophile. BMP-4, qui est ventral chez les vertébrés, est l'homologue de Decapentaplegic (Dpp) qui spécifie chez la drosophile le côté dorsal de l'embryon.

Illustrations d'après Ferguson, E.L. : Conservation of dorsal-ventral patterning in arthropods and chordates. Curr. Opin. Genet. Dev. 1996, 6 : 424-431.



plusieurs de ces gènes n'est pas réprimée par Ubx et ceci résulte en la formation d'une aile sur le segment T3 et non pas d'une haltère (Fig. 11.40). Cette aile postérieure est néanmoins différente de l'antérieure portée par le segment T2.

Des gènes autres que les gènes Hox sont impliqués dans la formation de la tête chez les arthropodes. Cette région du corps varie beaucoup d'un groupe d'arthropodes à l'autre (Fig. 14.11). Les araignées semblent ne pas avoir de tête et leur corps est divisé en une région antérieure (prosome) et postérieure (opisthosome). Le prosome, qui comprend à la fois la tête et le thorax, comporte des segments portant les chélicères, crochets venimeux caractéristiques du groupe des chélicérates (auquel appartiennent les araignées), des pédipalpes et quatre paires de pattes marcheuses. Malgré cette organisation très différente de celle des insectes, des mêmes gènes « de tête » sont exprimés dans la région antérieure des insectes et des araignées. Ils incluent orthodenticle, qui est impliqué dans la spécification de la tête et du cerveau antérieur chez la drosophile (Section 2.33) et le gène Hox labial, exprimé chez la drosophile dans le disque imaginal qui produit les palpes labiaux de l'adulte. Il semble donc que la morphologie de la tête a considérablement été modifiée chez les arthropodes via des changements dans les cibles de gènes comme orthodenticle et labial. Les homologues d'orthodenticle chez les vertébrés, les gènes Otx, sont également requis pour la spécification des structures antérieures, notamment le cerveau (Sections 4.14 et 12.2).

14.6 Le plan d'organisation de base des arthropodes et des vertébrés est similaire, mais l'axe dorso-ventral est inversé

La comparaison des plans d'organisation des arthropodes et des vertébrés révèle une différence intrigante. Malgré les similitudes, comme le fait d'avoir une tête, un tube digestif, un système nerveux s'étendant antéro-postérieurement et des appendices, l'axe dorso-ventral des chordés est inversé par rapport à celui des arthropodes. Ainsi le système nerveux central est entièrement dorsal chez les chordés, alors que chez les arthropodes la chaîne nerveuse du tronc est ventrale (Fig. 14.15, à gauche).

Une explication de cette différence, proposée initialement au XIX^e siècle par Geoffroy Saint Hilaire, est que, dans la lignée évolutive menant aux chordés et vertébrés, il y aurait eu une inversion de l'axe dorso-ventral de telle manière que la chaîne nerveuse ventrale de l'ancêtre serait devenue dorsale. Cette idée est confortée par des données moléculaires obtenues ces dernières années, montrant que les mêmes gènes sont exprimés le long de l'axe dorso-ventral des insectes et des vertébrés, mais de manière inversée. Cette inversion pourrait avoir été dictée par un changement de position de la bouche qui se serait éloignée du système nerveux central. La position de la bouche est spécifiée pendant la gastrulation chez les protostomiens, mais pas chez les deutérostomiens chez lesquels la bouche est une ouverture secondaire indépendante dont il n'est pas difficile d'imaginer que la position ait pu changer au cours de l'évolution. Il y a néanmoins également eu d'autres changements dans la structure du corps et du système nerveux.

Il a été vu dans les Chapitres 2 et 4 que la mise en place de l'organisation le long de l'axe dorso-ventral nécessite des signalisations entre les cellules. Chez le xénope, Chordin est une des molécules signal qui spécifient l'identité dorsale, alors que BMP-4 spécifie l'identité ventrale. Chez la drosophile, la situation est inversée : Decapentaplegic, un homologue de BMP-4, est le signal dorsal et Short gastrulation (Sog), l'homologue de Chordin, est le signal ventral (Fig. 14.15, à droite ; voir aussi Chapitre 2). Ces molécules de signalisation sont fonctionnellement interchangeables entre xénope et drosophile. Chordin peut promouvoir un développement ventral chez la drosophile et Decapentaplegic un développement ventral chez le xénope. Les molécules et les mécanismes qui mettent en place l'axe dorso-ventral chez les arthropodes et les vertébrés, sont donc homologues, suggérant fortement que les divergences entre les plans d'organisation de ces deux groupes aient impliqué une inversion de l'axe dorso-ventral et un mouvement de la position de la bouche. Le dernier ancêtre commun des chordés et des arthropodes était donc probablement un animal chez lequel les axes antéro-postérieur et dorso-ventral étaient similaires à ceux des animaux actuels.

14.7 Les membres des tétrapodes ont évolué à partir des nageoires

Les membres des vertébrés tétrapodes sont des caractères spéciaux qui se développent après le stade phylotypique. Les amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères ont des membres chiridiens (le plus souvent des pattes), alors que les poissons ont des nageoires. Les membres des premiers vertébrés terrestres ont évolué à partir des nageoires paires, pelviennes et pectorales, de leurs ancêtres aquatiques. L'organisation générale du membre des tétrapodes est fortement conservée, même s'il existe des différences entre membres antérieurs et postérieurs, ainsi qu'entre membres d'espèces différentes. Les modalités de l'apparition des nageoires constituent une question complexe. Plusieurs scénarios ont été proposés, notamment celui selon lequel les nageoires se seraient formées par subdivision d'un repli latéral du corps. La formation des nageoires implique des molécules de signalisation comme Sonic hedgehog (Shh) et FGF ainsi que des facteurs de transcription tels les protéines Hox, utilisés pour la formation du reste du corps.

D'autres facteurs de transcription importants qui ont été co-optés pour être utilisés dans la formation des appendices, sont ceux codés par les gènes Tbx4 et Tbx5 dont la fonction ancestrale est sans doute dans le développement du cœur (Section 11.32). Ces deux gènes sont exprimés dans les appendices antérieurs (Tbx5) ou postérieurs (Tbx4) chez les poissons et les tétrapodes (Section 11.2). L'amphioxus, qui n'a pas d'appendice pair, a un seul gène Tbx4/5 qui peut fonctionner de la même manière que les gènes de vertébrés dans la formation des membres. L'expression du gène Tbx4/5 d'amphioxus chez des souris chez lesquelles le gène Tbx5 a été invalidé, restaure en effet un développement normal du membre antérieur.

Le registre fossile suggère que la transition des nageoires vers le membre chiridien s'est faite au Dévonien, il y a entre 400 et 360 millions d'années, probablement chez des ancêtres aquatiques des tétrapodes, qui vivaient dans des eaux peu profondes et qui se sont déplacés vers la terre ferme. Les nageoires de sarcoptérygiens du Dévonien, comme *Panderichthys*, sont probablement à l'origine des membres des premiers tétrapodes, illustrés par le tétrapode du Dévonien *Tulerpeton* (Fig. 14.16). Les éléments squelettiques proximaux, correspondant à l'humérus, radius et ulna du membre des tétrapodes, étaient présents chez leurs ancêtres aquatiques et une analyse récente par tomographie de *Panderichthys* a montré l'existence d'éléments squelettiques distaux séparés dans la nageoire pectorale, qui pourraient être à l'origine des doigts.



du Dévonien, *Panderichthys*, il existait des éléments proximaux correspondant à l'humérus (stylopode), au radius et à l'ulna (zeugopode) et des éléments distaux (autopode). Le tétrapode du Dévonien *Tulerpeton* avait les mêmes éléments proximaux, mais possédait en plus des doigts reconnaissables.

D'après Boisvert, C.A. et al. : **The pectoral fin of Panderichthys and the origin of digits**. Nature 2008, **456** : 636-638.



Pour comprendre les bases génétiques de la transition de la nageoire vers le membre chiridien, des chercheurs se sont tournés vers le poisson-zèbre, un organisme modèle chez lequel le développement de la nageoire peut être suivi en détail et les gènes impliqués peuvent être identifiés. Le bourgeon de nageoire du poisson-zèbre ressemble initialement au bourgeon de membre des tétrapodes, mais des différences apparaissent très vite. Il y a quatre principaux éléments squelettiques proximaux dans une nageoire de poisson-zèbre, qui proviennent de la subdivision d'une structure cartilagineuse, et six à huit plus petits éléments nodulaires qui se développent plus distalement (Fig. 14.17). Ces éléments squelettiques supportent une région distale aplatie qui contient un grand nombre de rayons osseux. La différence essentielle entre le développement de la nageoire et du membre des tétrapodes est que, dans le bourgeon de nageoire du poisson-zèbre, un repli ectodermique se forme dans la partie distale du bourgeon, dans lequel se forment les rayons de la nageoire. La question est de savoir si certains des éléments squelettiques de la nageoire peuvent être considérés équivalents aux doigts des tétrapodes.

Comme dans le bourgeon de membre des tétrapodes (Chapitre 11), le gène clé est *Shh* qui est exprimé dans la partie postérieure du bourgeon de nageoire du poisson-zèbre. Celui-ci exprime également les gènes Hoxd et Hoxa. Initialement, des études ont montré que l'expression tardive des gènes Hox dans la région formant les doigts dans le bourgeon des tétrapodes (Section 11.13), n'existe pas chez le poisson-zèbre.



Fig. 14.17 Le développement de la nageoire pectorale du poisson-zèbre Danio. À gauche : la ceinture pectorale et le repli de la nageoire. Au milieu : quatre éléments proximaux cartilagineux et plusieurs éléments distaux nodulaires cartilagineux se sont formés. Des rayons se sont formés à l'extrémité du repli de la nageoire (peu visibles sur cette image). À droite : quatre éléments proximaux osseux et six à huit petits éléments nodulaires portent les rayons de la nageoire de l'adulte.

Photographies aimablement communiquées par D. Duboule, d'après Sordino P. et al. : **Hox gene** expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits. Nature 1995, **375** : 678-681.

Fig. 14.18 L'acquisition d'une nouvelle région régulatrice contrôlant l'expression des gènes Hox pourrait avoir conduit à la transition de la nageoire vers le membre des tétrapodes. Des régions régulatrices de part et d'autre des complexes Hoxa et Hoxd contrôlent l'expression des gènes Hox dans la nageoire des poissons et le membre des tétrapodes. Des expériences chez la souris montrent que dans le membre des tétrapodes, illustré ici par le bras humain, les *enhancers* du côté 3' (télomérique ; en orange) induisent l'expression dans les parties proximales du membre, alors que les *enhancers* du côté 5' (centromérique ; en violet) contrôlent l'expression des gènes Hox dans la partie distale du membre. Dans la nageoire des poissons, les *enhancers* 3' et 5' contrôlent également l'expression de gènes Hox dans différents domaines proximo-distaux du bourgeon de nageoire. Quand ils sont testés chez la souris, les *enhancers* du poisson induisent un *expression* uniquement proximale dans le membre. Chez le cœlacanthe, la région régulatrice en 5' contient un *enhancer*, aussi présent chez les tétrapodes mais pas chez les téléostéens. Il est suggéré que l'acquisition de cet *enhancer* et ses modifications subséquentes ont conduit à la transition de la nageoire vers le membre des tétrapodes et à l'évolution des doigts.

Reproduit d'après Woltering, J.M. et al. : **Conservation and divergence of regulatory** strategies at Hox loci and the origin of tetrapod digits. PLoS Biol. 2014, **12** : e1001773.

Ceci a conduit à l'hypothèse que les doigts des tétrapodes représentent une innovation évolutive et n'ont pas évolué à partir d'une structure déjà présente chez les poissons ancestraux. Des études plus récentes et plus détaillées ont néanmoins mis en évidence de plus grandes similitudes dans les profils d'expression des gènes Hoxd et Hoxa dans les bourgeons de membres des tétrapodes et de nageoire du poisson-zèbre. L'analyse des complexes Hoxa et Hoxd a montré que chez le poisson-zèbre comme chez la souris, les gènes vers l'extrémité 3' du complexe interagissent avec des *enhancers* situés du côté télomérique (3') du complexe, alors que ceux du côté 5' interagissent avec des *enhancers* du côté centromérique (5'). Les gènes au centre des complexes peuvent interagir avec les *enhancers* des deux côtés.

Dans les membres de la souris, les *enhancers* du côté centromérique contrôlent l'expression des gènes dans la région formant les doigts (Fig. 11.20). Quand les *enhancers* centromériques et télomériques des complexes Hox du poisson-zèbre sont testés dans des souris transgéniques, seule une expression proximale des gènes Hox est obtenue. Cela suggère que les doigts du membre des tétrapodes ont évolué grâce à l'acquisition de nouveaux éléments régulateurs dans la région 5' par rapport aux complexes Hoxa et Hoxd, permettant l'établissement d'une phase tardive d'expression des gènes Hox dans la région formant les doigts dans la partie distale du bourgeon de membre. Le génome du cœlacanthe, un poisson à nageoires charnues, proche phylogénétiquement des tétrapodes, contient un élément régulateur situé en 5' par rapport au complexe Hoxd, qui n'est pas retrouvé chez les poissons à nageoires rayonnées, mais qui est présent chez les tétrapodes. Cet élément régulateur peut induire l'expression de gènes Hox dans le bourgeon de membre de souris transgéniques et il a été proposé que cette nouvelle séquence ait pu contribuer à l'évolution de la régulation de gènes Hox et des doigts chez les tétrapodes (Fig. 14.18).

14.8 Les membres ont évolué pour exercer différentes fonctions spécialisées

La grande diversité de spécialisations anatomiques retrouvée dans les membres des mammifères (Fig. 14.19) est due à des changements à la fois dans la mise en place de l'organisation du membre et dans la croissance différentielle de ses parties pendant le développement embryonnaire. L'organisation de base du squelette ne change néanmoins pas, ce qui montre la modularité des éléments squelettiques. Ainsi les membres antérieurs d'une chauve-souris et d'un cheval ont la même organisation osseuse, mais ces membres ont été modifiés et spécialisés. On observe chez la chauve-souris, liés au vol, des doigts très allongés qui supportent une aile membraneuse, et chez le cheval, liés à la course, une réduction des doigts latéraux, un allongement du métacarpe central (os de la main dans l'espèce humaine), et une fusion du radius et de l'ulna qui confère plus de force. La nageoire des baleines est modifiée et permet d'équilibrer et de diriger les déplacements, et contient des doigts avec de nombreuses phalanges.









Figure 1

D'après Wieschampel, D.B. Dodson, P., Osmolska, H. (eds) The Dinosauria 2nd edition, University of California Press, 2004.

Les ailes des oiseaux possèdent trois doigts, la réduction du nombre de doigts étant une adaptation qui a permis l'évolution du vol. Une question controversée est de savoir si les doigts des oiseaux correspondent aux doigts 1, 2 et 3 ou 2, 3 et 4 du membre ancestral des tétrapodes. Cette question est importante pour retracer l'évolution des ailes des oiseaux à partir de leurs ancêtres dinosauriens. Un groupe de dinosauriens, appelés théropodes, fait le lien entre les pattes à cinq doigts des premiers dinosaures et l'aile à trois doigts des oiseaux (Figure 1). Les paléontologues ont considéré que les trois doigts des théropodes, par exemple *Allosaurus*, étaient des doigts 1, 2 et 3 et que les doigts 4 et 5 ont été perdus au cours de l'évolution de ce groupe. Selon ces données, les doigts de l'aile de poulet sont donc des doigts 1, 2 et 3.

Le type de perte de doigts observés chez les théropodes est inhabituel. Dans les autres cas, il s'agit en général des doigts

Une caractéristique de l'évolution des membres chez les vertébrés est, que si les réductions du nombre de doigts sont fréquentes (par exemple seulement trois doigts dans l'aile du poulet), il n'y a aucune espèce actuelle avec plus de cinq doigts. Le « pouce » du panda géant, qui ressemble à un sixième doigt, est en fait un os du poignet modifié. Des espèces avec plus de cinq doigts sont retrouvées parmi les tout premiers tétrapodes, mais il n'est pas clair qu'il y ait eu plus de cinq types de doigts morphologiquement distincts chez ces animaux. Dans les membres d'espèces actuelles présentant une polydactylie à



Fig. 14.19 Diversification des membres des tétrapodes. L'organisation générale des os du membre antérieur est conservée chez les tétrapodes, mais il y a des différences de proportion entre les os, ainsi que des fusions et des pertes de certains os. Dans la patte de cheval, le radius et l'ulna sont fusionnés en un seul os et le métacarpe du doigt central est fortement allongé. Il y a eu aussi des pertes et des réductions des autres doigts. Dans l'aile de chauve-souris, au contraire, les doigts sont très allongés et supportent l'aile membraneuse. Dans la nageoire des baleines, il y a eu une réduction de certains doigts et un allongement d'autres par augmentation du nombre de phalanges.

latéraux qui sont perdus (Section 14.12). Des études morphologiques classiques qui comparent l'ordre et la position selon lesquels se forment les doigts de l'aile du poulet par rapport à ce qui se passe dans le membre antérieur d'autres vertébrés (notamment alligators et tortues), ont suggéré que les doigts du poulet sont des doigts 2, 3 et 4, que le doigt 1 a été complètement perdu et qu'une condensation de cartilage qui apparaît de manière transitoire correspond au doigt 5 (Figure 2). Une expression antérieure et transitoire de Sox9 (un gène requis pour la différenciation du cartilage) pourrait représenter un vestige du doigt 1. Comment réconcilier ces deux théories ? Une suggestion, dite théorie du décalage (frame-shift theory) est que les doigts des oiseaux sont bien 1, 2 et 3, comme ceux des théropodes, mais, qu'au cours de l'évolution, ils ont changé de position pour occuper celles des doigts 2, 3 et 4 des autres tétrapodes. L'analyse comparative des profils d'expression des gènes Hox dans l'aile et la patte du poulet, ainsi que dans les pattes de la souris, soutient que les doigts de l'aile du poulet sont les doigts 1, 2 et 3. Des cartes de territoires présomptifs réalisées en greffant des tissus de poulet transgénique exprimant la GFP dans





Photos d'après Burke, A.C., Feduccia, A. : Developmental patterns and the identification of homologies in the avian hand. Science 1977, 278: 666-668...

des bourgeons de patte et d'aile, ainsi qu'en marquant génétiquement les cellules exprimant Shh dans des bourgeons de membre de souris, ont montré que les doigts de l'aile du poulet ont la même origine que les doigts 1, 2 et 3 de la patte de poulet et de souris.

Le débat n'est néanmoins pas clos : des domaines d'expression de *Sox9* ne représentent pas forcément des doigts et des cartes

cause d'une mutation, au moins deux doigts sont toujours les mêmes (Encart 11C). Il semble donc y avoir une contrainte liée au développement qui empêche de produire au cours de l'évolution plus de cinq types de doigts. Il a été proposé que seuls cinq doigts différents peuvent se former car il n'y a que cinq gènes Hoxd exprimés dans la partie distale du bourgeon de membre et donc seulement cinq identités possibles pour les doigts, mais cette hypothèse séduisante est probablement fausse.

Une réduction du nombre de doigts s'est répétée plusieurs fois au cours de l'évolution des tétrapodes. Dans les membres de plusieurs espèces de lézards australiens du genre Hemigeris, la perte des doigts est corrélée avec une réduction de l'étendue et de la durée d'expression de Shh dans la zone à activité polarisante. Des changements dans la voie de signalisation Shh ont été également été observés dans le bourgeon de membre précoce des embryons de bovins et un changement dans un élément régulateur d'un gène de la voie a été identifié. Chez les chameaux et les chevaux, en revanche, la perte de doigts semble due à des morts cellulaires très importantes tard dans le développement du membre. Une réduction du nombre de phalanges par doigt est aussi courante. Chez les dauphins et les baleines, en revanche, le nombre de phalanges a fortement augmenté (Fig. 14.19) et il a été proposé que cela soit dû à la persistance de la crête apicale ectodermique qui prolonge la croissance du bourgeon de membre.

de territoires présomptifs ne donnent qu'une vue rétrospective de l'évolution. Cet exemple montre la difficulté d'intégrer les données paléontologiques à celles provenant du développement des espèces actuelles. Au contraire, l'étude des changements morphologiques récents, par exemple la perte des épines pelviennes chez les épinoches, peut permettre de déterminer les bases génétiques des changements évolutifs (Section 14.9).

ENCART 14C La réduction des structures pelviennes chez les épinoches est due à des mutations dans la région régulatrice d'un gène

Les épinoches marines à trois épines possèdent des épines pelviennes dentelées sur leur face ventrale, leur nom scientifique Gasterosteus aculeatus signifiant d'ailleurs « estomac osseux avec épines ». Des populations de ces épinoches qui ont envahi des lacs d'eau douce dans différentes régions du monde, incluant l'Écosse, le Canada et l'Alaska, après la dernière glaciation, ont évolué vers une forme dont les structures pel-



Figure 1 D'après Chan, Y.F. et al. : Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a Pitx1 enhancer. Science 2010, **327** : 302-305.

viennes (ceinture et épines) sont réduites, voire absentes. Des croisements entre des individus de ces différentes populations ont identifié une région du génome, contenant le gène *Pitx1*, qui est liée à la variation de la taille des épines. Cependant aucune mutation de la région codante de *Pitx1* n'a pu être identifiée. Ce gène n'est néanmoins pas exprimé dans la région pelvienne en développement des poissons dont les structures pelviennes sont très réduites, ce qui suggère que des mutations dans un élément régulateur de *Pitx1* pourraient être à l'origine de l'absence d'épines.

Pour localiser cet élément régulateur, des transgènes rapporteurs, composés de la région codante de la GFP fusionnée à 2,5 kb d'ADN situé en amont de la région codante de *Pitx1* (ce fragment est supposé contenir les éléments *cis*-régulateurs de *Pitx1*), ont été construits. Ils ont été injectés dans des œufs fécondés de l'épinoche marine, qui se sont ensuite développés. Quand le fragment d'ADN de *Pitx1* provient d'un poisson marin, la GFP est fortement exprimée dans la région pelvienne en développement. Si le fragment provient d'un poisson à épines réduites (le fragment est plus petit à cause d'une délétion), aucune expression de la GFP n'est observée (Figure 1). Les rectangles en traits pointillés blancs dans les images de gauche indiquent la région montrée à plus fort grossissement dans les images de droite (la zone pelvienne est entourée par des pointillés). Ces expériences suggèrent que la région en amont de la région codante de Pitx1 contient un enhancer qui active l'expression du gène dans la région pelvienne des poissons marins, mais que cet enhancer n'est pas fonctionnel ou a été éliminé chez les poissons dont les structures pelviennes sont réduites. Afin de tester cette hypothèse, la région *cis*-régulatrice de *Pitx1* de poissons marins a été fusionnée à la région codante de *Pitx1* et cette construction a été injectée dans des œufs de poissons n'ayant pas d'épines pelviennes. Cette injection provoque la formation d'épines pelviennes, ce qui montre que la réduction des structures pelviennes chez les épinoches d'eau douce est due à des mutations dans la région régulatrice de *Pitx1* (Figure 2).



Figure 2 D'après Chan, Y.F. et al. : **Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a Pitx1 enhancer**. Science 2010, **327** : 302-305.



14.9 L'évolution adaptative au sein d'une même espèce permet d'étudier les modifications du développement à la base des changements évolutifs

À cause de l'existence de formes morphologiquement très différentes au sein de la même espèce, dues à une évolution adaptative, l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus*, est un bon modèle pour étudier les mécanismes du développement impliqués dans les changements évolutifs. Des épines pelviennes (nageoires pelviennes modifiées servant à la protection contre des prédateurs) sont présentes chez les individus des populations marines, mais sont réduites ou perdues de manière répétée dans les populations d'eau douce, à cause d'un défaut de développement du bourgeon de nageoire pelvienne (Fig. 14.20). Ces populations d'eau douce se sont isolées après avoir colonisé de nouveaux lacs et cours d'eau formés par la fonte des glaciers après la glaciation survenue il y a 20 000 ans. Grâce à des croisements d'individus de populations marines et dulcicoles, il a été mis en évidence que la réduction des structures pelviennes est due à des mutations dans la région régulatrice du gène *Pitx1* qui code un facteur de transcription (Encart 14C).

La perte des épines pelviennes est un exemple intéressant d'évolution convergente, car différentes populations ont des mutations différentes du gène *Pitx1*, qui ont été sélectionnées indépendamment dans chaque population. *Pitx1* est connu pour son rôle clé dans le développement des membres postérieurs des vertébrés (Section 11.2). L'invalidation génétique de *Pitx1* chez la souris provoque la réduction du développement des membres postérieurs, la patte droite étant plus affectée que la gauche. Cette asymétrie dans la réduction des pattes est probablement due à l'expression du gène *Pitx2* dans la partie gauche du corps (Section 5.16), qui compense partiellement l'absence de fonction de *Pitx1*. La réduction des épines pelviennes chez l'épinoche est également asymétrique, étant plus marquée du côté droit.

Mais pourquoi les épines pelviennes ont-elles été perdues chez les épinoches dulcicoles ? Deux facteurs environnementaux peuvent l'expliquer : la quantité limitée dans l'eau douce de calcium disponible pour la formation d'os et la nécessité moindre de protection contre la prédation.

Un autre exemple intrigant d'évolution du développement a déjà été rencontré chez le téléostéen *Astyanax mexicanus* (Section 11.27). *Astyanax mexicanus* présente deux formes radicalement différentes : une forme de surface pigmentée avec des yeux fonctionnels ; une forme cavernicole aveugle et dépigmentée (Fig. 11.49). Au moins 30 populations cavernicoles différentes sont retrouvées dans des grottes immergées au Mexique. Ces populations sont isolées des populations de surface depuis quelques millions d'années. Bien que les adultes cavernicoles soient dépourvus d'yeux fonctionnels, une ébauche d'œil se forme chez les embryons puis dégénère. La cause majeure de la dégénérescence de l'œil est l'apoptose des cellules du cristallin en formation, ce qui empêche la croissance des autres tissus de l'œil comme la rétine. Le **Fig. 14.20** Perte des épines pelviennes **chez l'épinoche** *Gasterosteus aculeatus*. En haut : les populations marines et certaines populations dulcicoles d'épinoches ont une paire d'épines pelviennes (en rouge sur le dessin). Les poissons des populations marines ont également des plaques osseuses sur leurs flancs (en jaune) et trois épines dorsales (en bleu). En bas : dans certaines populations dulcicoles, les épines pelviennes ont été perdues et la ceinture pelvienne est fortement réduite, ceci résultant d'une mutation du gène *Pitx1*.

D'après Tickle, C., Cole, N.J. : Morphological diversity : Taking the spine out of threespine stickleback. Curr. Biol. 2004, 14 : R422-R424.





Fig. 14.21 Les yeux simples retrouvés chez certains non vertébrés pourraient ressembler à l'œil ancestral des bilatériens. Sont illustrés ici l'œil larvaire de l'annélide polychète *Platynereis* (en haut) et un des nombreux yeux de la planaire *Polycelis auricularia* (en bas). Dans les deux cas, les yeux comportent une cellule photoréceptrice et une cellule pigmentaire.

D'après Gehring, W.J. : Chance and necessity in eye evolution. Genome Biol. Evol. 2011, **3** : 1053-1056, and Arendt, D. : Évolution of eyes and photoreceptor cell types. Int. J. Dev. Biol. 2003, **47** : 563-571. non-développement de l'œil cause des différences crânio-faciales entre les poissons cavernicoles et ceux de surface. L'apoptose des cellules du cristallin est due à une augmentation de la signalisation Shh le long de la ligne médiane embryonnaire chez les poissons cavernicoles par rapport aux embryons des poissons de surface. La cause génétique de cette augmentation n'est pas connue. Des travaux récents suggèrent que la sélection naturelle a agi sur des variations pré-existantes dans les populations. La protéine Hsp60 semble limiter la variation de la taille de l'œil chez les poissons de surface. L'environnement des grottes aurait perturbé ce système, démasquant ainsi des variations de la taille des yeux sur lesquelles la sélection naturelle a pu agir.

Les yeux se forment initialement puis dégénèrent pendant la vie larvaire ou adulte chez tous les vertébrés cavernicoles aveugles. Ceci peut paraître surprenant. Peut-être que le développement des yeux est nécessaire à d'autres étapes essentielles du développement et ne peut donc être éliminé. À cause de cette forte contrainte liée au développement, il est improbable que des vertébrés cavernicoles sans yeux embryonnaires puissent être découverts. Mais pourquoi les poissons cavernicoles ont-ils perdu leurs yeux ? La réponse n'est pas connue. Une suggestion récente est que la perte des yeux serait une conséquence indirecte de la sélection de gènes nécessaires pour le développement d'autres modalités sensorielles requises pour l'adaptation à l'obscurité.

14.10 L'évolution de différents types d'yeux dans différents groupes d'animaux est un exemple d'évolution parallèle utilisant un circuit génétique ancien

Charles Darwin considérait l'évolution des yeux des vertébrés comme l'un des problèmes les plus difficiles de l'évolution. La biologie moléculaire moderne a donné un nouvel éclairage à ce problème et a mis en évidence un exemple de conservation de la fonction d'un gène dans l'ensemble des espèces animales.

Comme cela a été vu, la conservation remarquable de la fonction de *Pax6/eyeless* est démontrée par le fait que le gène *Pax6* de la souris peut se substituer à *eyeless* et induire la formation d'yeux ectopiques chez la drosophile, s'il est exprimé dans le disque imaginal d'antenne (Fig. 11.48). Quelle que soit l'origine du gène *Pax6*, l'œil qui se forme est toujours un œil de drosophile et pas celui de l'animal dont provient le gène *Pax6*. *Pax6* est un gène-maître qui déclenche le programme de développement de l'œil de la drosophile.

La découverte de cette conservation de la fonction de Pax6 a suggéré à de nombreux biologistes que les différents yeux retrouvés chez les animaux sont des exemples d'évolutions parallèles qui ont coopté le même circuit génétique et les mêmes spécialisations cellulaires, qui étaient déjà présents chez les ancêtres de tous les bilatériens, voire même des ancêtres plus anciens. Les animaux dérivent probablement d'ancêtres unicellulaires (Section 14.2) qui pouvaient posséder des organites photosensibles similaires à ceux retrouvés chez les flagellés actuels. Cet organite transmet des signaux au flagelle et permet à la cellule de se diriger vers la lumière. L'évolution de la multicellularité et de différents types cellulaires peut avoir ensuite donné naissance à des cellules photoréceptrices simples, telles celles présentes dans l'ectoderme des larves de méduses actuelles. Ces cellules n'utilisent pas uniquement les opsines comme protéines photoréceptrices, comme le font tous les animaux et certains unicellulaires, mais contiennent également de la mélanine qui est le pigment retrouvé dans l'épithélium pigmenté de la rétine de l'œil des vertébrés. La fonction du pigment est d'absorber la lumière qui traverse la couche des photorécepteurs, empêchant la réflexion de la lumière vers les photorécepteurs, ce qui produirait un signal imprécis.

L'étape suivante de l'évolution des yeux aurait été la différenciation, à partir de la cellule photoréceptrice ancestrale, de deux types de cellules, la cellule photoréceptrice sensorielle et la cellule pigmentaire (Fig. 14.21). L'idée que l'origine de l'œil implique ces deux types de cellules remonte à Darwin. Des « yeux » simples, faits d'une cellule photoréceptrice et d'une cellule pigmentaire, sont retrouvés dans les larves de nombreux bilatériens. L'œil frontal de la larve d'un céphalochordé, l'amphioxus, qui comporte des cellules pigmentaires et deux rangs de photorécepteurs connectés par des

Fig. 14.22 Modifications des arcs branchiaux au cours de l'évolution des mâchoires chez les vertébrés. L'ancêtre hypothétique dépourvu de mâchoires des vertébrés avait une série d'au moins sept fentes branchiales supportées par des arcs branchiaux cartilagineux. Les mâchoires ont évolué par modifications du premier arc branchial qui est devenu l'arc mandibulaire, avec le cartilage mandibulaire de la mâchoire inférieure et postérieurement l'arc hyoïde. Le spiracle est une ouverture respiratoire postérieure à l'œil retrouvée chez les chondrichthyens actuels.

neurones au système nerveux central, préfigure les yeux des vertébrés. Quand et comment *Pax6* est devenu un gène crucial pour le développement de l'œil n'est pas connu.

Les cristallines, les protéines qui donnent leur transparence au cristallin des céphalopodes (pieuvres et calmars) et des vertébrés, ont également une histoire évolutive intrigante. Ces protéines ont longtemps été considérées comme étant spécifiques du cristallin, mais des recherches récentes ont montré qu'elles ne sont pas spécialisées structurellement pour une fonction dans le cristallin et que, dans d'autres contextes, elles peuvent agir comme des enzymes.

14.11 Des structures embryonnaires ont acquis de nouvelles fonctions au cours de l'évolution

Si deux groupes d'animaux, par exemple les poissons et les mammifères, qui diffèrent grandement dans leur structure adulte et leurs habitats, passent par un stade embryonnaire très similaire, cela peut indiquer qu'ils descendent d'un ancêtre commun et qu'ils sont proches d'un point de vue évolutif. Le développement d'un embryon peut donc refléter l'histoire évolutive de ses ancêtres. La subdivision du corps en segments qui ensuite divergent structurellement et fonctionnellement, est une caractéristique commune des arthropodes et des vertébrés. Les arcs et fentes viscéraux constituent un exemple de structures segmentées présentes dans tous les embryons de vertébrés et situées à l'arrière de la tête, de part et d'autre de celle-ci.

Ces structures ne sont pas des reliques des branchies présentes chez l'adulte des ancêtres aquatiques des vertébrés, mais correspondent à des structures présentes chez les embryons de ces ancêtres et qui sont les précurseurs pendant le développement des branchies et des arcs branchiaux. Au cours de l'évolution, ces arcs ont donné naissance aux arcs branchiaux des premiers poissons dépourvus de mâchoires et, par la suite, aux branchies et à des éléments de la mâchoire des poissons gnathostomes (Fig. 14.22). Ces arcs se sont par la suite encore plus modifiés. Chez les mammifères, ils donnent naissance à différentes structures de la face et du cou (Fig. 14.23), la







Fig. 14.23 Devenir des cartilages des arcs branchiaux chez l'espèce humaine. Dans

l'embryon, du cartilage se forme dans les arcs branchiaux, et produit des éléments des trois osselets de l'oreille moyenne, de l'os hyoïde et du squelette pharyngien. La destinée des différents éléments est indiquée par un code couleur.

Illustration d'après Larsen, W.J. : Human Embryology. New York : Churchill Livingstone, 1993. Fig. 14.24 Évolution des os de l'oreille

moyenne des mammifères. Les os articulaire et carré des « reptiles » ancestraux (à gauche) faisaient partie de l'articulation de la mâchoire inférieure. Les sons étaient transmis vers l'oreille interne *via* ces os et leurs connexions au *stapes* (étrier). Chez les mammifères (à droite), la mâchoire inférieure n'est plus constituée que d'un seul os, le dentaire. L'articulaire est devenu le *malleus* (marteau) et la carré est devenu l*e malleus* (enclume). Ces os transmettent les sons de la membrane tympanique vers l'oreille interne. La trompe d'Eustache se forme entre les arcs branchiaux I et II.

Illustration d'après Romer, A.S. : The Vertebrate Body. *Philadelphia : W.B.* Saunders, 1949.



plupart dérivant des cellules des crêtes neurales qui migrent dans les arcs branchiaux tôt dans le développement (Section 5.15). La fente entre les deux premiers arcs devient l'ouverture de la trompe d'Eustache et les cellules endodermiques des fentes produisent diverses glandes, telles la thyroïde et le thymus.

L'évolution produit rarement, voire même jamais, une structure complètement nouvelle à partir de rien. Une nouvelle structure anatomique provient généralement des modifications d'une structure existante. On peut penser à l'évolution comme du « bricolage » de structures existantes pour produire graduellement de nouvelles choses. Cela est possible car beaucoup de structures, comme les vertèbres et les membres, sont modulaires, c'est-à-dire constituées de différentes parties qui peuvent évoluer indépendamment.

Un joli exemple de la modification d'une structure existante est donné par l'évolution de l'oreille moyenne des mammifères. Celle-ci contient trois osselets, le marteau (ou *malleus*), l'enclume (ou *incus*) et l'étrier (ou *stapes*), qui transmettent les sons du tympan vers l'oreille interne. Chez les ancêtres « reptiliens » des mammifères, l'articulation entre le crâne et la mâchoire inférieure se faisait grâce à deux os, le carré au niveau du crâne et l'articulaire de la mâchoire inférieure, qui étaient aussi impliqués dans la transmission des sons (Fig. 14.24). La mâchoire inférieure des vertébrés était originellement constituée de plusieurs os, mais au cours de l'évolution des mammifères, un de ces os, le dentaire, a accru sa taille pour constituer à lui seul la mâchoire et les autres os ont été perdus. L'articulaire a perdu son rattachement à la mâchoire inférieure et, suite à des modifications de leur développement, l'articulaire et le carré sont devenus, respectivement, le marteau et l'enclume, uniquement impliqués dans la transmission des sons. Le carré dérive du cartilage dorsal du premier arc branchial de l'ancêtre des vertébrés et l'étrier dérive du cartilage du second arc branchial de cet ancêtre.

Ces exemples montrent la relation fondamentale qui existe entre évolution et développement, le changement graduel d'une structure vers une forme différente. Dans de nombreux cas, par exemple celui de l'évolution du premier arc branchial en mâchoire, nous ne comprenons néanmoins pas comment des formes intermédiaires ont pu conférer un avantage sélectif aux animaux les ayant possédées. Nous ne savons pas et, vu notre ignorance de l'écologie d'organismes ayant vécu dans un lointain passé, nous ne saurons peut-être jamais.

RÉSUMÉ

Des groupes d'animaux qui passent par des stades de développement similaires descendent d'un ancêtre commun et ont modifié certains circuits génétiques au cours de leur évolution. Le plan d'organisation de base de tous les animaux est défini par les profils d'expression des gènes Hox qui codent une information de position dont l'interprétation a changé au cours de l'évolution. Les gènes Hox eux-mêmes ont subi une considérable évolution par duplications et divergences géniques. Les membres des vertébrés tétrapodes ont évolué à partir de nageoires, avec une acquisition des doigts chez les tétrapodes, qui est liée à une nouvelle régulation de l'expression des gènes Hox. La comparaison de l'expression de gènes le long de l'axe dorso-ventral suggère une inversion de l'axe dorso-ventral au cours de l'évolution des vertébrés. Les épinoches constituent un bon modèle d'étude des modifications du développement à l'origine des changements morphologiques au cours de l'évolution. Au cours de l'évolution, le développement de certaines structures peut être altéré de telle manière qu'elles acquièrent de nouvelles fonctions, comme l'illustre l'évolution des osselets de l'oreille moyenne des mammifères à partir des os de la mâchoire de leurs ancêtres, eux-mêmes dérivant d'éléments squelettiques d'arcs branchiaux ancestraux.



Changements dans la durée, la vitesse et la chronologie des processus de développement

Dans cette partie du chapitre, seront considérés les changements dans la durée, la vitesse et la chronologie des processus de développement, par exemple la croissance et la maturation sexuelle, qui peuvent avoir des effets majeurs sur l'évolution de la morphologie et du comportement des animaux.

14.12 Des modifications de la croissance peuvent modifier le plan d'organisation du corps

Des différences de taux de croissance pendant le développement embryonnaire constituent une des façons majeures par lesquelles des parties du corps peuvent être modifiées au cours de l'évolution pour acquérir des fonctions spécialisées. La croissance différentielle peut modifier les proportions des diverses parties du corps du bébé humain après sa naissance, la tête croissant beaucoup moins que le reste du corps (Fig. 1.17). Les différentes morphologies faciales des races de chien, qui appartiennent toutes à la même espèce dérivée du loup gris, constituent également un bon exemple des effets de la croissance différentielle après la naissance. Tous les chiens naissent Fig. 14.25 Évolution du membre antérieur chez les chevaux. Hvracotherium, le premier vrai équidé, avait la taille d'un grand chien. Ses pattes antérieures comportaient quatre doigts, l'un d'entre eux (le doigt 3 en terme anatomique) étant un peu plus long que les autres à cause d'une croissance plus forte. Tous les doigts étaient en contact avec le sol. Avec l'augmentation de taille des équidés, les doigts latéraux ont perdu le contact avec le sol, à cause de l'augmentation proportionnellement plus grande de la taille du doigt central. Par la suite, les doigts latéraux sont devenus encore plus petits à cause d'un autre changement génétique. Illustration d'après Gregory, W.K. : Évolution Emerging. New York : Macmillan, 1957.



avec une face ronde ; certains comme les bouledogues et les carlins, conservent cette forme, mais chez d'autres, comme les lévriers et les pointers anglais, la région nasale et les mâchoires s'allongent pendant la croissance. La face allongée des babouins est également due à la croissance de cette région après la naissance.

Des structures individuelles, comme les os, pouvant croître à des vitesses différentes, la forme générale d'un organisme peut changer de manière importante au cours de l'évolution à cause de changements transmissibles de la durée de la croissance, qui conduisent aussi à une augmentation de la taille globale de l'organisme. Chez les équidés, par exemple, le doigt central de l'ancêtre du cheval a crû plus vite que les doigts latéraux et est donc devenu plus grand que ceux-ci (Fig. 14.25). La taille des animaux a augmenté au cours de l'évolution des équidés et les doigts latéraux ont fini par ne plus toucher le sol à cause de la longueur excessive du doigt central. Plus tardivement dans l'évolution, ces doigts latéraux, devenus inutiles, se sont réduits en taille à cause d'un autre changement génétique qui a conduit à de la mort cellulaire intense dans les parties latérales de la palette de la main formant les doigts.

Il a déjà été mentionné que les os des doigts de l'aile de chauve-souris sont fortement allongés (Fig. 14.19). Les longueurs relatives des différents os du membre postérieur de la chauve-souris sont en revanche similaires à celles du membre postérieur de la souris. Chez la chauve-souris, il y a des différences de taille des membres antérieurs et postérieurs dès les stades embryonnaires précoces, bien que l'augmentation de la taille des doigts de l'aile se produise assez tardivement, une fois les principaux éléments squelettiques formés. Chez le kiwi, un oiseau qui ne peut pas voler, les bourgeons d'ailes sont de petite taille comparés à celle des bourgeons de patte, même aux stades précoces du développement (Fig. 14.26).

Le facteur de transcription à homéodomaine Prx1 est fortement produit dans la région distale de l'aile de chauve-souris en développement et cela pourrait contribuer à l'allongement des doigts. Quand l'*enhancer* du gène *Prx1* de souris est remplacé par celui de la chauve-souris dans des souris transgéniques, une faible mais significative augmentation de la longueur du membre antérieur est observée. L'allongement des doigts de l'aile de chauve-souris pourrait aussi être stimulé par une seconde vague d'expression de Shh détectée tardivement après que les ébauches des doigts se sont



formées. La protéine FGF-8 est également produite et pourrait prolonger la croissance des doigts. Le mécanisme postulé est similaire à celui proposé pour expliquer l'allongement des doigts des nageoires des baleines (Section 14.8), même si dans ce cas, la croissance prolongée aboutirait à la formation de phalanges additionnelles et non pas à leur allongement.

14.13 L'évolution peut être due à des changements de vitesse, de durée et de chronologie des processus de développement

Des différences entre espèces concernant le moment où se déroulent les processus de développement les uns par rapport aux autres et par rapport à ce qui se passait chez l'ancêtre, peuvent avoir des effets majeurs sur la morphologie et le comportement des animaux. Des différences dans la morphologie des pattes chez des espèces d'un genre de salamandres tropicales, illustrent très bien ce type d'effets. Beaucoup d'espèces du genre *Bolitoglossa* sont arboricoles et leurs pattes sont adaptées à grimper sur des surfaces lisses. Les pattes des espèces arboricoles sont plus petites et plus palmées que celles des espèces purement terrestres et leurs doigts sont plus courts (Fig. 14.27). Ces différences semblent principalement dues au fait que le développement et la croissance des pattes cessent plus tôt chez les espèces arboricoles que chez les autres. Le terme utilisé pour décrire ce genre de différences temporelles dans le développement est l'hétérochronie.

Parmi les exemples les plus clairs d'hétérochronies se retrouvent les modifications de la période d'acquisition de la maturité sexuelle chez des organismes qui passent par un stade larvaire. L'acquisition de la maturité sexuelle par un animal qui est encore à l'état larvaire est un processus qui s'appelle la **néoténie**. Cela se passe chez un type de salamandre, l'axolotl *Ambystoma mexicanum* : la larve croît en taille, devient sexuellement mature et de ce fait ne se métamorphose pas. L'animal sexuellement mature reste aquatique et ressemble à une larve de très grande taille. Il est néanmoins possible d'induire une métamorphose de l'axolotl en le traitant avec de la thyroxine (Fig. 14.28).

Le cycle vital de nombreux animaux comporte un stade où ils se présentent sous forme d'une larve libre et nageuse, capable de se nourrir et de se disperser, et qui ensuite se métamorphose en adulte. Le fond du développement est le changement **Fig. 14.26** Expression du développement des membres conduisant à leur taille chez l'adulte. En haut : la chauve-souris *Rousettus amplexicaudatus* a de grands membres antérieurs et des petits membres postérieurs, ce qui est reflété par la taille des bourgeons de membre au cours du développement. En bas : le kiwi (*Apteryx australis*) a des petits membres antérieurs et de grands membres postérieurs à tous les stades du développement.

D'après Richardson MK. : **Vertebrate** evolution : the developmental origins of adult variation. Bioessays 1999, 21 : 604-613.





Fig. 14.27 Hétérochronie chez les salamandres. Chez les espèces non arboricoles du genre *Bolitoglossa* (en haut), les pattes sont grandes avec de longs doigts et sont moins palmées que celles des espèces arboricoles (en bas). Cette différence peut être attribuée à une croissance s'arrêtant plus tôt lors du développement des espèces arboricoles. Barre d'échelle = 1 mm.



Fig. 14.28 Néoténie chez les salamandres.

L'axoloti sexuellement mature (*Ambystoma mexicanum*) conserve des caractéristiques larvaires, comme la présence de branchies et mode de vie restant aquatique. Cette forme néoténique peut se métamorphoser en un adulte terrestre après traitement à la thyroxine, normalement non produite dans cette espèce et qui est l'hormone provoquant la métamorphose chez les autres amphibiens (Section 13.13).

Fig. 14.29 Développement de la

grenouille *Eleutherodactylus*. La plupart des grenouilles, comme *Rana*, ou le xénope pondent leurs œufs dans l'eau et ont un développement indirect qui passe par un stade têtard aquatique. Les grenouilles du genre *Eleutherodactylus* pondent leurs œufs sur la terre et des petites grenouilles éclosent à partir de ces œufs, sans qu'il n'y ait de stade larvaire aquatique. La queue embryonnaire sert d'organe respiratoire. graduel ; au moment de la métamorphose, il n'y a néanmoins pas de continuité entre la larve et l'adulte. La métamorphose prend plus de sens évolutif si on considère que les formes larvaires ont évolué *via* l'insertion d'un stade larvaire dans un programme de développement pré-existant d'un animal se développant de manière directe, peut-être résultant d'une hétérochronie. Chez de nombreux non-vertébrés, la larve ressemble initialement au stade gastrula tardif qui a pu donner naissance au stade larvaire libre. Les stades larvaires ne peuvent pas représenter l'état originel car la métamorphose est un processus très complexe et il est difficile d'imaginer comment la métamorphose a pu évoluer autrement que par une ré-entrée dans le programme de développement.

Chez les vertébrés qui subissent une métamorphose, les grenouilles par exemple, si nous admettons que leurs ancêtres se développaient de manière directe, un changement du moment auquel se passent certains événements post-neurulation, par exemple un délai dans la formation des pattes postérieures, pourrait avoir conduit à l'acquisition de la mobilité et à l'évolution d'un têtard capable de se nourrir. Devenir mobile a pu aider à la dispersion, mais pour devenir un adulte capable de se reproduire, la larve a besoin de revenir vers un programme de développement normal. C'est le principe de ce qu'est la métamorphose.

Les stades larvaires peuvent aussi être perdus au cours de l'évolution. Certaines grenouilles actuelles, par exemple celles du genre *Eleutherodactylus*, contrairement aux amphibiens plus typiques que sont *Rana* et *Xenopus*, se développent de manière directe et il n'y a pas de stade larvaire aquatique, les œufs étant déposés dans la terre. Les structures typiquement larvaires, comme les branchies et les glandes adhésives, ne se développent pas et des bourgeons de membre proéminents apparaissent peu de temps après la formation du tube neural (Fig. 14.29). Dans l'embryon, la queue est devenue un organe respiratoire. Un tel développement direct demande qu'une grande quantité de vitellus soit déposée dans l'œuf pour permettre un développement jusqu'au stade adulte sans passer par un stade larvaire capable de se nourrir. L'augmentation de la quantité de vitellus pourrait elle-même être due à une hétérochronie provoquant une vitellogenèse plus longue ou plus rapide.

La plupart des oursins passent également par un stade larvaire qui dure un mois ou plus avant qu'ils ne deviennent adultes. Chez certaines espèces un développement direct est néanmoins observé. Ces espèces, dépourvues de stade larvaire, ont des œufs de grande taille et, grâce à un développement très rapide, deviennent des



oursins juvéniles en quatre jours. Ceci a nécessité des changements du développement précoce, de telle manière que l'embryon donne naissance à une « larve » sans tube digestif, qui se métamorphose très vite en adulte.

14.14 L'évolution des cycles vitaux a des implications pour le développement

Les animaux et les plantes ont des cycles vitaux très divers : de petits oiseaux se reproduisent pendant le printemps qui suit leur naissance et font ainsi chaque année jusqu'à leur mort ; les saumons du Pacifique se reproduisent et meurent à l'âge de trois ans ; et les chênes ont besoin de 30 ans de croissance avant de produire des milliers de glands. Pour comprendre l'évolution de tels cycles vitaux, les chercheurs en écologie évolutive les considèrent en utilisant les notions de probabilités de survie, de taux de reproduction et d'optimisation de l'effort reproductif. Ces facteurs ont d'importantes implications pour l'évolution des stratégies de développement, en particulier en relation avec la vitesse du développement. Ainsi le cycle vital de nombreux animaux comporte un stade larvaire libre qui est distinct et souvent plus simple que le stade adulte sexuellement mature et qui se nourrit de manière différente.

Les cycles vitaux aident à comprendre l'évolution des insectes à bandelette germinative longue, comme la drosophile, qui ont une origine plus récente que les insectes à bandelette germinative courte comme les sauterelles (Section 2.23). Ces derniers, contrairement à la drosophile, n'ont pas de stade larvaire et se développent directement en cinq à six jours en une forme immature qui est un adulte en miniature. La drosophile en revanche forme en 24 heures une larve capable de se nourrir. Il est facile d'imaginer les conditions dans lesquelles des insectes dont les larves se nourrissent très rapidement, auraient eu un avantage sélectif par rapport aux autres. Il est aussi possible que les embryons soient plus vulnérables que les adultes et qu'il puisse y avoir une sélection pour réduire la durée du développement. Il est donc probable que les mécanismes de développement des insectes à bandelette germinative longue, qui mettent en place un axe antéro-postérieur complet dans l'œuf, ont évolué sous une pression sélective en faveur d'un développement rapide.

Les variations de la taille des œufs peuvent aussi être comprises dans le contexte des cycles vitaux. Si nous admettons que les parents ont des ressources énergétiques limitées à placer dans la reproduction, la question est comment ces ressources sontelles le mieux investies dans la formation des gamètes, en particulier femelles. Est-il plus avantageux de produire beaucoup de petits œufs ou peu de grands ? En général, il semble qu'un œuf plus grand donne un individu plus grand à la naissance et qui a plus de chance de survivre. Les œufs plus gros devraient donc être privilégiés. Pourquoi certaines espèces produisent-elles donc beaucoup de petits œufs à développement rapide ? Une réponse possible est que l'investissement parental dans la production de gros œufs pourrait réduire la chance de survie des parents eux-mêmes et donc leur possibilité de produire d'autres œufs. La stratégie de produire beaucoup de petits œufs pourrait être particulièrement importante dans des conditions environnementales changeantes, dans lesquelles une population peut soudainement disparaître. Le développement rapide des larves leur permettrait de se nourrir très tôt et de se disperser dans de telles circonstances.

RÉSUMÉ

Des changements dans la durée, la vitesse et la chronologie des processus de développement, produits au cours de l'évolution, peuvent modifier la forme du corps. Certaines régions du corps peuvent croître plus vite que d'autres et leur taille est augmentée proportionnellement si l'animal devient plus grand. L'accroissement de la taille du doigt central des chevaux est en partie dû à ce type de changements du développement. La vitesse du développement et la taille des œufs ont aussi des implications évolutives importantes. Changer la période pendant laquelle l'animal devient sexuellement mature, peut résulter en des adultes avec des caractéristiques larvaires. Le stade larvaire peut également être perdu chez certaines espèces par exemple de grenouilles et d'oursin, lesquelles présentent alors un développement direct. Les cycles vitaux ont également des conséquences sur l'évolution et le développement.



Résumé du Chapitre 14

- De nombreux processus du développement ont été conservés au cours de l'évolution. Bien que de nombreuses questions relatives à l'évolution et au développement restent ouvertes, il est clair que le développement reflète l'histoire évolutive des embryons ancestraux.
- L'origine des animaux (métazoaires) et de leurs embryons, à partir d'un ancêtre unicellulaire, est encore très hypothétique. L'analyse de génomes complets des animaux d'émergence précoce (comme les éponges, les cnidaires et les cténophores), a montré que les ancêtres des animaux possédaient déjà une partie importante des voies de signalisation et des propriétés cellulaires retrouvées chez les animaux actuels.
- Tous les embryons de vertébrés passent par un stade de développement conservé, le stade phylotypique, pendant lequel ils partagent de nombreuses propriétés morphologiques, bien qu'il puisse y avoir une considérable divergence avant et après ce stade.
- Les signaux impliqués dans la mise en place de l'axe dorso-ventral du corps des vertébrés et des arthropodes, montrent de fortes similitudes et des analyses comparatives ont suggéré qu'il y a eu une inversion de l'axe dorso-ventral au cours de l'évolution des vertébrés.
- Il existe une corrélation entre les différences de profils d'expression des gènes Hox chez les serpents et les autres vertébrés, et les morphologies différentes de ces animaux, notamment le nombre de vertèbres avec une identité thoracique. Des changements dans la région régulatrice d'un gène cible des protéines Hox ont été identifiés chez les serpents. Des modifications de l'expression des gènes Hox et de l'interprétation du code Hox ont pu conduire à des changements morphologiques au cours de l'évolution.
- Le membre des tétrapodes a évolué à partir de la nageoire de leurs lointains ancêtres poissons et l'analyse comparative de la régulation des gènes Hox dans les appendices pairs des téléostéens, du cœlacanthe et des mammifères, a identifié des modifications de régions régulatrices pouvant être significatives pour cette évolution.
- Même si les profils d'expression des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur du corps sont globalement conservés dans les différentes classes d'arthropodes, des variations de ces profils sont corrélées avec des différences du plan d'organisation, ainsi que dans le nombre et les positions des appendices.
- Des analyses génétiques de changements évolutifs récents dans des populations naturelles d'animaux, comme les épinoches et les poissons cavernicoles, apportent un éclairage sur les mécanismes de l'évolution. Chez les épinoches, un changement morphologique

majeur est dû à des changements dans la région régulatrice d'un gène clé du développement.

 Les modifications de la durée, de la vitesse et de la chronologie des événements du développement, ont joué un rôle important dans l'évolution. Ces modifications peuvent altérer la forme et la taille globales des organismes, les proportions de certaines de leurs parties et conduire à l'acquisition de la maturité sexuelle à l'état larvaire.

Questions de révision

Sujets de synthèse

1. Retracer les étapes possibles de l'évolution des métazoaires à partir d'un ancêtre unicellulaire. Quelles sont les innovations clés qui ont conduit à l'évolution des animaux, plus particulièrement ceux à symétrie bilatérale ?

2. Pourquoi le stade phylotypique a-t-il été aussi fortement conservé au cours de l'évolution ? Quels événements et processus se déroulent-ils à ce stade et en font un stade aussi important du développement animal ?

3. Donner un exemple de changement dans la structure et la fonction d'une protéine et un exemple de changement d'expression génique, survenus après une duplication génique.

4. Le membre des tétrapodes a évolué à partir de nageoires. Quelles conclusions concernant cette transition peut-on tirer à partir de (1) l'étude des fossiles et (2) l'étude du développement de la nageoire du poisson-zèbre. S'il était possible d'obtenir des embryons d'un des premiers tétrapodes connus, par exemple *Panderichthys*, quelles expériences seraient à faire pour étudier les bases moléculaires de l'évolution vers le membre des tétrapodes ?

5. Les larves de drosophile n'ont pas de patte, contrairement à celles des lépidoptères chez lesquelles existent des pattes thoraciques et abdominales. Expliquer les rôles des gènes Hox et *Distal-less* dans cette différence.

6. Les serpents ont un corps allongé avec de nombreuses vertèbres similaires et pas de pattes. Comment ces caractéristiques se relient-elles à des modifications de la fonction des gènes Hox ? Considérer à la fois les changements dans l'expression des gènes Hox et dans la manière dont l'information codée par les gènes Hox est interprétée.

7. Les « pinsons de Darwin » constituent un exemple du rôle du développement dans l'évolution. Qu'est-ce qui est connu à propos des modifications du développement à la base de l'évolution adaptative de la forme du bec de ces pinsons ? Quelles questions fondamentales restent ouvertes et qu'est-il possible de faire pour y répondre ?

8. Résumer les informations des Fig. 14.22, 14.23 et 14.24 et décrire l'évolution des osselets de l'oreille moyenne des mammifères.

9. Expliquer ce que signifie le terme hétérochronie et donner un exemple d'un changement évolutif qui peut être décrit comme résultant d'une hétérochronie.

10. En utilisant des exemples repris du texte de ce chapitre, discuter comment les probabilités de survie, les taux de reproduction

et l'optimisation de l'effort reproductif peuvent provoquer des changements évolutifs du développement.

QCM

NB. Il n'y a qu'une seule réponse correcte à chaque question

- **1.** L'ontogenèse est
- a) le développement d'un organisme individuel
- b) le développement de l'oreille
- c) l'histoire évolutive d'une espèce ou d'un groupe d'espèces
- d) l'étude du cancer
- 2. Un exemple d'un animal triploblastique est
- a) l'hydre
- b) les éponges
- c) le xénope
- d) les plantes triploïdes comme les pastèques sans pépins

3. Parmi les couples d'animaux suivants, lequel contient les animaux les plus proches d'un point de vue lien de parenté ?

- a) Caenorhabditis elegans et l'amphioxus
- b) L'espèce humaine et la drosophile
- c) L'espèce humaine et les oursins
- d) Les escargots et les étoiles de mer

4. L'évolution des complexes de gènes Hox des vertébrés implique probablement

- a) des duplications d'un complexe ancestral pour produire quatre complexes ancestraux, suivies de duplications en tandem différentes dans les différents complexes
- b) des changements aléatoires dans la séquence de l'ADN, suivis de sélection naturelle, conduisant à l'évolution indépendante de chacun des gènes Hox à partir de séquences n'ayant rien à voir les unes avec les autres
- c) des duplications en tandem d'un gène ancestral, suivies de duplications du complexe entier
- d) la génération de quatre gènes Hox ancestraux sur des chromosomes séparés, suivie par des duplications en tandem conduisant à la production de quatre complexes Hox
- 5. La surface ventrale d'un animal est définie par
- a) l'expression des gènes de la famille BMP
- b) la position de la bouche
- c) la surface de l'animal qui fait face au sol
- d) le côté opposé à celui où se trouve le système nerveux central
- 6. L'homologue dans l'espèce humaine du sabot du cheval est
- a) les doigts ou les orteils
- b) l'humérus
- c) le radius et l'ulna
- d) les os du poignet
- 7. Dans l'espèce humaine, les arcs branchiaux sont
- a) des fentes branchiales embryonnaires, reflétant notre évolution à partir de poissons
- b) les précurseurs embryonnaires des branchies qui ne poursuivent pas leur développement
- c) les précurseurs embryonnaires de structures principalement de la mâchoire
- d) des structures embryonnaires qui forment les côtes

8. L'acquisition, au cours de l'évolution, de la maturité sexuelle par un animal encore à l'état larvaire s'appelle

- a) apoptose
- b) métamorphose
- c) néoténie
- d) ontogenèse
- 9. Laquelle des phrases suivantes est vraie ?
- a) Les ailes de chauve-souris ont évolué à partir des ailes d'oiseau
- b) Les oreilles ont évolué à partir des mâchoires
- c) Les insectes ont évolué à partir des crustacés
- d) Les membres des tétrapodes ont évolué à partir de nageoires

10. La perte des épines pelviennes pendant l'évolution adaptative des épinoches est basée sur

- a) une mutation dans la région codante du gène Pitx1
- b) une mutation dans la région codante du gène Pitx2
- c) une mutation dans la région régulatrice du gène Pitx1
- d) la même mutation du gène *Pitx1* dans des populations d'épinoches dépourvues d'épines pelviennes et distinctes géographiquement.

Réponses aux QCM

1 : a, 2 : c, 3 : c, 4 : c, 5 : b, 6 : a, 7 : c, 8 : c, 9 : d, 10 : c.

Références bibliographiques générales

- Carroll, S.B. : **Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis : a genetic theory of morphological evolution**. *Cell* 2008, **134** : 25–36.
- Carroll, S.B., Grenier, J.K., Weatherbee, S.D. : *From DNA to Diversity*, 2nd edn. Malden, MA : Blackwell Science, 2005.

Finnerty, J.R., Pang, K., Burton, P., Paulson, D., Martindale, M.Q. : Origins of bilateral symmetry : Hox and *dpp* expression in a sea anemone. *Science* 2004, **304** : 1335–1337.

Hoekstra, H.E., Coyne, J.A. : The locus of evolution : evo devo and the genetics of adaptation. Évolution 2007, 61 : 995–1016.

Kirschner, M., Gerhart, J. : Evolvability. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1998, 95 : 8420–8427.

Kirschner, M., Gerhart, J. : *The Plausibility of Life*. Yale University Press, 2005.

Raff, R.A. : *The Shape of Life*. University of Chicago Press, 1996. Richardson, M.K. : **Vertebrate evolution : the developmental**

origins of adult variation. *BioEssays* 1999, **21** : 604–613. Wray, G.A. : The evolutionary significance of *cis*-regulatory

mutations. Nat. Rev. Genet. 2007, 8: 206–216.

ENCART 14A Les pinsons de Darwin

Abzhanov, A., Kuo, W.P., Hartmann, C., Grant, B.R., Grant, P.R., Tabin, C.J. : The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. *Nature* 2006, 442 : 563–567.

Références bibliographiques spécifiques

14.1 Des études génomiques nous éclairent sur l'origine des métazoaires

- Petersen, C.P., Reddien, P.W. : Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 2009, **139** : 1056–1068.
- Putnam, N.H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V.V.

et *al.* : Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 2007, **317** : 86–94.

Richards, G.S., Degnan, B.M. : The dawn of developmental signaling in the metazoa. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2009, 74 : 81–90.

Ryan, J.F., Pang, K., Schnitzler, C.E., Nguyen, A.D., Moreland, R.T., Simmons, D.K., Koch, B.J., Francis, W.R., Havlak, P., NISC Comparative Sequencing Program, Smith et *al.* : The genome of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and its implications for cell type evolution. *Science* 2013, 342 : 1242592.

Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N.H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M.L. et al. : The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature* 2008, 454 : 955–960.

14.2 Les animaux ont évolué à partir d'ancêtres unicellulaires

Brooke, N.M., Holland P.W.H. : **The evolution of multicellularity and early animal genomes**. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003, **6** : 599–603.

Jaegerstern, G. : The early phylogeny of the metazoa. The bilaterogastrea theory. *Zool. Bidrag. (Uppsala)* 1956, **30** : 321–354.

King, N. : The unicellular ancestry of animal development. *Dev. Biol.* 2004, **7** : 313–325.

King, N., Westbrook, M.J., Young, S.L., Kuo, A., Abedin, M., Chapman, J., Fairclough, S., Hellsten, U., Isogai, Y., Letunic, I. et *al.*: The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* 2008, **451**: 783–788.

Martindale, M.Q. : The evolution of metazoan axial properties. *Nat. Rev. Genet.* 2005, **6** : 917–927.

Miller, D.J., Ball, E.E. : Animal evolution : the enigmatic phylum Placozoa revisited. *Curr. Biol.* 2005, **15** : R26–R28.

Rudel, D., Sommer, R.J. : The evolution of developmental mechanisms. Dev. Biol. 2003, 264 : 15–37.

Szathmary, E., Wolpert, L. : The transition from single cells to multicellularity. In *Genetic and Cultural Évolution of Cooperation* (ed.Hammersteen, P.) 271–289. Cambridge, MA : MIT Press, 2004.

Wolpert, L. : Gastrulation and the evolution of development. Development (Suppl.) 1992, 7–13.

Wolpert, L., Szathmary, E. : Évolution and the egg. *Nature* 2002, **420** : 745.

14.3 Les complexes de gènes Hox ont évolué par duplications géniques

Brooke, N.M., Gacia-Fernandez, J., Holland, P.W.H. : The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 1998, **392** : 920–922.

Duboule, D. : The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* 2007, **134** : 2549–2560.

Ferrier, D.E.K., Holland, P.W.H. : Ancient origin of the Hox gene cluster. Nat. Rev. Genet. 2001, 2 : 33–34.

Holland, L.Z. *et al.* : The amphioxuss genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.* 2008, 18 : 1100–1111.

Pascual-Anaya, J., D'Aniello, S., Kuratani, S., Garcia-Fernandez,
J. : Évolution of Hox gene clusters in deuterostomes. *BMC Dev. Biol.* 2013, 13 : 26.

Prince, V.E., Pickett, F.B. : Splitting pairs : the diverging fates of duplicated genes. *Nat. Rev. Genet.* 2002, **3** : 827–837.

Valentine, J.W., Erwin, D.H., Jablonski, D. : **Developmental** evolution of metazoan bodyplans : the fossil evidence. *Dev. Biol.* 1996, **173** : 373–381.

14.4 Des modifications des gènes Hox et de leurs gènes cibles contribuent à la diversification des plans d'organisation des bilatériens

- Akam, M. : **Hox genes and the evolution of diverse body plans**. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 1995, **349** : 313–319.
- Cohn, M.J., Tickle, C. : **Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes**. *Nature* 1999, **399** : 474–479.
- Duboule, D. : **A Hox by any other name**. *Nature* 2000, **403** : 607–610.
- Galant, R., Carroll, S.B. : Évolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature* 2003, **415** : 910–913.
- Guerreiro, I., Nunes, A., Woltering, J.M., Casaca, A., Nóvoa, A., Vinagre, T., Hunter M. E., Duboule, D., Mallo, M. : Role of a polymorphism in a Hox/Pax-responsive enhancer in the evolution of the vertebrate spine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2013, 110 : 10682–10686.
- Mansfield, J.H. : *cis*-regulatory change associated with snake body plan evolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2013, 110 : 10473–10474.
- Nishimoto, S., Minguillon, C., Wood, S., Logan, M.P. : A combination of activation and repression by a colinear Hox code controls forelimb-restricted expression of Tbx5 and reveals Hox protein specificity. *PLoS Genet*. 2014, **10** : e1004245.
- Pavlopoulos, A., Averof, M. : **Developmental evolution : Hox** proteins ring the changes. *Curr. Biol.* 2002, **12** : R291–R293.
- Woltering, J.M., Vonk, F.J., Müller, H., Bardine, N., Tuduce,
 I.L., de Bakker, M.A., Knöchel, W., Sirbu, I.O., Durston, A.J.,
 Richardson, M.K. : Axial patterning in snakes and caecilians :
 evidence for an alternative interpretation of the Hox code.
 Dev. Biol. 2009, 332 : 82–89.

14.5 Des différences d'expression des gènes Hox déterminent des variations du positionnement et du type d'appendices chez les arthropodes

- Angelini, D.R., Kaufman, T.C. : **Comparative developmental genetics and the evolution of arthropod body plans**. *Annu. Rev. Genet.* 2005, **39** : 95–119.
- Averof, M. : Origin of the spider's head. *Nature* 1998, **395** : 436–437.
- Carroll, S.B., Weatherbee, S.D., Langeland, J.A. : Homeotic genes and the regulation and evolution of insect wing number. *Nature* 1995, **375** : 58–61.
- Levine, M. : How insects lose their wings. *Nature* 2002, **415** : 848–849.
- Liubicich, D.M., Serano, J.M., Pavlopoulos, A., Kontarakis, Z., Protas, M.E., Kwan, E., Chatterjee, S., Tran, K.D., Averof, M., Patel, N.H. : Knockdown of *Parhyale Ultrabithorax* recapitulates evolutionary changes in crustacean appendage morphology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009, **106** : 13892–13896.
- Pavlopoulos, A., Akam, M. : Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of Drosophila haltere morphogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2011, 108 : 2855–2860.
- Pavlopoulos, A., Kontarakis, Z., Liubicich, D.M., Serano, J.M., Akam, M., Patel, N.P., Averof, M. : **Probing the evolution of appendage specialization by Hox gene misexpression in an**

emerging model crustacean. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2009, 106 : 13897–13902.

Weatherbee, S.D., Carroll, S. : Selector genes and limb identity in arthropods and vertebrates. *Cell* 1999, **97** : 283–286.

Weatherbee, S.D., Nijhout, H.F, Grunnert, L.W., Halder, G., Galant, R., Selegue, J., Carroll, S. : Ultrabithorax function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Curr. Biol.* 1999, **9** : 109–115.

14.6 Le plan d'organsation de base des arthropodes et des vertébrés est similaire, mais l'axe dorso-ventral est inversé

- Arendt, D., Nübler-Jung, K. : Dorsal or ventral : similarities in fate maps and gastrulation patterns in annelids, arthropods and chordates. *Mech. Dev.* 1997, 61 : 7–21.
- Davis, G.K., Patel, N.H. : The origin and evolution of segmentation. *Trends Biochem. Sci.* 1999, **24** : M68–M72.
- Gerhart, J., Lowe, C., Kirschner, M. : Hemichordates and the origins of chordates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005, 15 : 461–467.
- Holley, S.A., Jackson, P.D., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E., Hoffman, F.M., Ferguson, E.L. : A conserved system for dorso-ventral patterning in insects and vertebrates involving *sog* and *chordin*. *Nature* 1995, **376** : 249–253.
- Mizutani, C.M., Bier, E. : **EvoD/Vo : the origins of BMP signalling in the neuroectoderm**. *Nat. Rev. Genet.* 2008, **9** : 663–677.

14.7 Les membres des tétrapodes ont évolué à partir des nageoires

- Ahn, D., Ho, R.K. : **Tri-phasic expression of posterior Hox genes during development of pectoral fins in zebrafish : implications for the evolution of vertebrate paired appendages**. *Dev. Biol.* 2008, **322** : 220–233.
- Amemiya, C.T. *et al.* : The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature*, 2013, **496** : 311–316.
- Boisvert, C.A., Mark-Kurik, E., Ahlberg, P.E. : **The pectoral fin** of *Panderichthys* and the origin of digits. *Nature* 2008, 456 : 636–638.
- Cooper, K.L., Sears, K.E., Uygur, A., Maier, J., Baczkowski, K.S., Brosnahan, M., Antczak, D., Skidmore, J.A., Tabin, C.J. : Patterning and post-patterning modes of evolutionary digit loss in mammals. *Nature* 2014, **511** : 41–45.
- Cooper, L.N., Berta, A., Dawson, S.D., Reidenberg, J.S. : Évolution of hyperphalangy and digit reduction in the cetacean manus. *Anat. Rec.* 2007, **290** : 654–672.
- Hoff, M. : A footnote to the evolution of digits. *PLoS Biol.* 2014, **12** : e1001774.
- Lopez-Rios, J. *et al.* : Attenuated sensing of SHH by Ptch1 underlies evolution of bovine limbs. *Nature* 2014, **511** : 46–51.
- Minguillon, C., Gibson-Brown, J.J., Logan, M. P. : **Tbx4/5 gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages**. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009, **106** : 21726–21730.
- Richardson, M. K., Oelschläger, H.H. : **Time, pattern, and heterochrony : a study of hyperphalangy in the dolphin embryo flipper**. *Evol Dev.* 2002 **4** : 435–444.
- Sordino, P., van der Hoeven, F., Duboule, D. : Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits. *Nature* 1995, **375** : 678–681.
- Tabin, C.J. : Why we have (only) five fingers per hand : hox genes and the evolution of paired limbs. *Development* 1992, 116 : 289–296.

Woltering, J.M., Noordermeer, D., Leleu, M., Duboule, D. : **Conservation and divergence of regulatory strategies at** *Hox* **loci and the origin of tetrapod digits**. *PLoS Biol.* 2014, **12** : e1001773.

Yano, T., Tamura, T. : The making of differences between fins and limbs. J. Anat. 2013, 222 : 100–113.

14.9 L'évolution adaptative au sein d'une même espèce permet d'étudier les modifications du développement à la base des changements évolutifs

- Chan, Y.F., Marks, M.E., Jones, F.C., Villarreal, G., Jr., Shapiro, M.D., Brady, S.D., Southwick, A.M., Absher, D.M., Grimwood, J., Schmutz, J. et *al.* : Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a *Pitx1* enhancer. *Science* 2010, **327** : 302–305.
- Gompel, N., Carrol, S.B. : Genetic mechanisms and constraints governing the evolution of correlated traits in drosophilid flies. *Nature* 2003, **424** : 931–935.
- Gompel, N., Prud'homme, B., Wittkopp, P.J., Kassner, V.A., Carroll, S.B. : Chance caught on the wing : cis-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila*. *Nature* 2005, **433** : 481–487.
- Jeffery, W.R. : Évolution and development in the cavefish Astyanax. Curr. Top. Dev. Biol. 2009, 86 : 191–221.
- Rohner, N., Jarosz, D.F., Kowalko, J.E., Yoshizawa, M., Jeffery, W.R., Borowsky, R.L., Lindquist, S., Tabin, C.J. : Cryptic variation in morphological evolution : HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish. *Science* 2013, 342 : 1372–1375.
- Shapiro, M.D., Marks, M.E., Peichel, C.L., Blackman, B.K., Nereng, K.S., Jonsson, B., Schluter, D., Kingsley, D.M. : Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* 2004, 428 : 717–723.
- Yamamoto, Y., Stock, D.W., Jeffery, W.R. : Hedgehog signaling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 2004, 431 : 844–847.
- Yoshizawa, M., Yamamoto, Y., O'Quin, K. E, Jeffery, W.R. : Évolution of an adaptive behavior and its sensory receptors promotes eye regression in blind cavefish. *BMC Biol.* 2012, 10 : 108.

14.10 L'évolution de différents types d'yeux dans différents groupes d'animaux est un exemple d'évolution parallèle utilisant un circuit génétique ancien

- Arendt, D. : Évolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev. Biol.* 2003, 563–571.
- Gehring, W.J. : Chance and necessity in eye development. *Genome Biol. Evol.* 2011, **3** : 1053–1056.
- Halder, G., Callaerts, P., Gehring, W.J. : Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 1995, **267** : 1788–1792.
- Shubin, N., Tabin, C., Carroll, S. : Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 2009, **457** : 818–823.

Wawersik S., Maas, R.L. : Vertebrate eye development as modeled in Drosophila. Hum. Mol. Genet. 2000, 9 : 917–925.

14.11 Des structures embryonnaires ont acquis de nouvelles fonctions au cours de l'évolution

Cerny, R., Lwigale, P., Ericsson, R., Meulemans, D., Epperlein, H.H.Bronner-Fraser, M. : **Developmental origins and evolution of jaws : new interpretation of 'maxillary' and 'mandibular'**. *Dev Biol.* 2004, **276** : 225–236.

- Cohn, M.J. : Lamprey Hox genes and the origin of jaws. *Nature* 2002, **416** : 386–387.
- De Robertis, E.M. : **Evo-devo :variations on ancestral themes**. *Cell* 2008, **132** : 185–195.
- Erwin, D.H.: Early origin of the bilaterian developmental toolkit. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2009, 364 : 2253–2261.

Romer, A.S. : *The Vertebrate Body*. Philadelphia : W.B. Saunders, 1949.

14.12 Des modifications de la croissance peuvent modifier le plan d'organisation du corps

Behringer, R.R., Rasweiler, J.J., Chen, C.H., Cretekos, C.J. : Genetic regulation of mammalian diversity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2009, **74** : 297–302.

- Hockman, D., Cretekos, C.J., Mason, M.K, Behringer, R.R, Jacobs, D.S., Illing, N. : A second wave of Sonic hedgehog expression during the development of the bat limb. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008, 105 : 16982–16987.
- Richardson, M.K. : Vertebrate evolution : the developmental origins of adult variation. *BioEssays* 1999, **21** : 604–613.

14.13 L'évolution peut être due à des changements de vitesse, de durée et de chronologie des processus de développement

- Alberch, P., Alberch, J. : Heterochronic mechanisms of morphological diversification and evolutionary change in the neotropical salamander *Bolitoglossa occidentales* (Amphibia : Plethodontidae). J. Morphol. 1981, 167 : 249–264.
- Lande, R. : **Evolutionary mechanisms of limb loss in tetrapods**. Évolution 1978, **32** : 73–92.
- Raynaud, A. : Developmental mechanism involved in the embryonic reduction of limbs in reptiles. Int. J. Dev. Biol. 1990, 34 : 233–243.
- Wray, G.A., Raff, R.A. : The evolution of developmental strategy in marine invertebrates. *Trends Evol. Ecol.* 1991, 6 : 45–56.

14.14 L'évolution des cycles vitaux a des implications pour le développement

Partridge, L., Harvey, P. : The ecological context of life history evolution. *Science* 1988, **241** : 1449–1455.

ENCART 14B L'évolution des ailes des oiseaux

Burke, A.C., Feduccia, A. : Developmental patterns and the identification of homologies in the avian hand. *Science* 1997, 278 : 666–669.

Feduccia, A., Lingham-Soliar, T., Hinchliffe, J. R. : Do feathered dinosaurs exist ? Testing the hypothesis on neontological and paleontological evidence. J. Morphol. 2005, 226 : 125–166.

Tamura, K., Nomura, N., Seki, R., Yonei-Tamura, S., Yokoyama, H. : **Embryological evidence identifies wing digits in birds as digits 1**, **2**, **and 3**. *Science* 2011, **331** : 753–757.

Towers, M., Signolet, J., Sherman, A., Sang, H., Tickle, C. : Insights into bird wing evolution and digit specification from polarizing region fate maps. *Nat. Commun.* **2** : 426.

Vargas, A.O., Fallon, J.F. : **The digits of the wing of birds are 1**, **2**, **and 3. A review**. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 2005, **304** : 206-219.

Xu, X., Mackem, S. : Tracing the evolution of avian wing digits. *Curr. Biol.* 2013, **23** : R538–R544.

Glossaire

Aboral : désigne le côté opposé à la bouche chez l'embryon d'oursin.

Acheiropodie : syndrome humain rare caractérisé par l'absence des structures au-delà du coude et du genou, et par aucune autre anomalie.

Achondroplasie : forme de nanisme où les membres sont proportionnellement courts par rapport au restant du corps.

Acide rétinoïque : petite molécule de signalisation de nature non protéique ayant de nombreux rôles dans le développement.

Acrosome : structure vésiculaire située à l'extrémité de la tête du spermatozoïde qui contient des enzymes et diverses autres protéines. *Voir aussi Réaction acrosomique*.

Activateur : protéine de régulation génique qui participe à l'activation d'un gène en se liant à un site particulier dans la zone de contrôle du gène.

Actomyosine : assemblage de faisceaux de filaments d'actine et de filaments de protéine motrice myosine, capable de contraction.

Adhésivité cellulaire : propriété qu'ont les cellules à pouvoir adhérer entre elles ou à un substrat. Elle se réalise par l'entremise de jonctions d'adhérence dans lesquelles des molécules d'adhérence cellulaires se lient à des molécules identiques ou différentes portées par les cellules voisines ou présentes dans un substrat.

Affinité : force d'interaction d'une molécule au niveau d'un site particulier d'une autre molécule.

Aire fonctionnelle : désigne chacune des aires du cortex cérébral dédiée à une fonction particulière, tels que les cortex visuel, cortex moteur, et cortex sensoriel.

Aire opaque : aire sombre entourant le blastoderme de poulet.

Aire pellucide : aire claire entourant le blastoderme de poulet.

Albumen : tissu nourricier présent dans les graines des angiospermes servant de ressource nutritive pour l'embryon. *Voir aussi Endosperme*.

Allantoïde : ensemble membranaire extra-embryonnaire qui se développe chez beaucoup d'embryons de vertébrés. Chez les oiseaux et les reptiles, l'allantoïde emmagasine les déchets liquides et possède un rôle respiratoire de surface, alors que chez les mammifères, sa vascularisation est en relation étroite avec le placenta.

Allèle : version particulière d'un gène. Chez les organismes diploïdes, deux allèles de chaque gène sont présents (un sur chaque chromosome d'une paire homologue), et ceux-ci peuvent être identiques ou différents.

Amas proneural : petit groupe de cellules dans le neuroectoderme dont une cellule donnera ultérieurement un neuroblaste.

Amnios : membrane formée d'ectoderme et de mésoderme extraembryonnaire qui, chez les oiseaux, reptiles et mammifères, forme une poche remplie de liquide qui contient et protège le fœtus. Amnioséreuse : membrane extra-embryonnaire située sur le côté dorsal de l'embryon de drosophile.

Amniotes : vertébrés chez lesquels se développe une annexe embryonnaire, l'amnios. Ils comprennent les reptiles, les oiseaux et les mammifères.

Analyse par puces à ADN : technique permettant de détecter et d'évaluer l'expression d'un grand nombre de gènes simultanément, par hybridation d'ARN cellulaires ou de sondes ADN avec des oligonucléotides représentant des séquences géniques.

Anamniotes : vertébrés dont les embryons sont dépourvus d'amnios. Ce sont les poissons et les amphibiens.

Androgénote : embryon chez lequel les deux lots de chromosomes homologues sont d'origine paternelle.

Angioblaste : précurseur cellulaire mésodermique à l'origine des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins.

Angiogenèse : processus par lequel de petits vaisseaux sanguins se forment à partir de vaisseaux pré-existants plus importants.

Aniridie : anomalie oculaire due à l'absence d'iris.

Anneau contractile : structure contractile composée d'actomyosine, qui se met en place autour d'une cellule animale au niveau du plan de division. La contraction de l'anneau génère le sillon de division qui sépare les cellules filles.

Anneau germinatif : désigne chez l'embryon du poisson-zèbre, quand le blastoderme couvre la moitié supérieure de la zone vitelline, un renflement dû au fait que sous la couche enveloppante, les territoires périphériques blastodermiques se replient sur euxmêmes.

Antérieur : à, ou dans la direction, de l'extrémité céphalique d'un embryon ou d'un animal.

Anticlinal : qualifie les divisions cellulaires organisées selon des plans perpendiculaires à la surface externe d'un tissu.

Apoptose (ou mort cellulaire programmée) : type de mort cellulaire se produisant largement lors du développement. La cellule est amenée à se « suicider » suite à un signal externe ou interne, en se fragmentant, comme son ADN, sans libération de son contenu cytoplasmique. Les cellules apoptotiques sont éliminées par des cellules phagocytaires, et contrairement à la nécrose, leur mort ne cause pas de dommages aux cellules voisines.

Archentéron : cavité formée à l'intérieur d'un embryon suite à l'invagination de l'endoderme et du mésoderme au cours de la gastrulation, et qui est à l'origine du tube digestif.

Arcs branchiaux : structures qui se développent de chaque côté de la tête de l'embryon et qui donnent naissance aux arcs branchiaux chez les poissons, et aux mâchoires ainsi qu'à certaines structures faciales chez d'autres vertébrés.

ARN antisens : ARN dont la séquence nucléotidique est complémentaire d'un ARNm. En s'hybridant à l'ARNm, il bloque la traduction de celui-ci et la production de la protéine.

ARN anti-sens morpholino : type d'ARN anti-sens constitué d'analogues nucléotidiques morpholinos stables.

ARN messager (ARNm) : molécule d'ARN qui définit la séquence des acides aminés d'une protéine. Elle est produite par transcription à partir de l'ADN.

miARN : voir microARN.

ARN non-codant : parmi le grand nombre d'ARN codés par le génome, désigne n'importe lequel d'entre eux ne possédant pas de fonction codante pour des protéines. Beaucoup agissent comme ARN de régulation génique.

Aster : structure présente à chaque pôle d'un fuseau de division cellulaire, constituée de microtubules rayonnant autour d'un centrosome et ancrés dans le cortex cellulaire.

Asymétrie gauche-droite : asymétrie bilatérale dans l'agencement et la structure de la plupart des organes internes des vertébrés. Chez les souris et l'espèce humaine, par exemple, le cœur est à gauche, le poumon droit a plus de lobes que le gauche, l'estomac et la rate sont disposés sur la gauche.

Asymétrie populationnelle : mode de division des cellules souches proposé pour expliquer la dynamique du renouvellement de l'épiderme.

Autonome : se dit pour tout processus du développement qui peut se poursuivre en dehors de la présence continue de signaux extracellulaires. *Voir aussi Autonomie cellulaire*.

Autonomie cellulaire : se dit des effets d'un gène qui affectent uniquement la cellule dans laquelle il est exprimé.

Auxine : petite molécule organique correspondant à une hormone végétale importante, impliquée dans la quasi-totalité des aspects du développement des plantes. L'auxine agit en régulant l'expression des gènes de réponse à l'auxine en stimulant la dégradation des protéines Aux/IAA et en permettant ainsi l'expression génique.

Axe adaxial-abaxial : chez les plantes, axe reliant le centre de la tige à sa circonférence. Au niveau des feuilles, il relie la face supérieure à la face inférieure (de la face dorsale à la face ventrale).

Axe animal-végétatif : axe joignant le pôle animal au pôle végétatif dans un œuf ou un embryon précoce.

Axe antéro-postérieur : axe qui s'étend de la tête (région antérieure) à la queue (région postérieure) d'un animal. Dans le membre des tétrapodes, cet axe s'étend du pouce au petit doigt.

Axe apico-basal : chez les plantes, axe reliant l'extrémité de la tige (apicale) à l'extrémité de la racine (basale) d'une plante.

Axe dorso-ventral : axe du corps qui s'étend de la face supérieure (dorsale) vers la face inférieure (ventrale) d'un organisme ou d'une structure. La bouche est toujours du côté ventral.

Axe embryonnaire-abembryonnaire : dans le blastocyste de mammifère, désigne l'axe passant par le site d'attache de la masse cellulaire interne au trophectoderme (pôle embryonnaire) et la région qui lui est opposée (pôle abembryonnaire).

Axe médio-latéral : axe corporel chez les vertébrés qui court depuis la ligne médiane vers la périphérie.

Axe oral-aboral : chez les oursins et d'autres organismes à symétrie radiaire, désigne l'axe allant du centre de la bouche au côté corporel opposé à cette dernière.

Axe proximo-distal : axe d'un membre ou d'un autre appendice (une feuille d'une plante, par exemple) qui s'étend du point d'attache au corps ou de la tige (partie proximale) jusqu'à l'extrémité de la structure considérée (partie distale). **Axe radiaire :** axe reliant le centre d'une structure à sa circonférence.

Axone : long processus cellulaire d'un neurone qui conduit l'influx nerveux à partir du corps cellulaire. L'extrémité de l'axone, la terminaison axonale, établit des contacts (synapses) avec d'autres neurones, des cellules musculaires ou glandulaires.

Bandelette germinative : région ventrale du blastoderme de l'embryon précoce de drosophile à partir de laquelle se développe l'essentiel du tronc de l'embryon.

 β -caténine : protéine fonctionnant à la fois comme co-facteur de transcription et comme protéine liant des jonctions d'adhérence au cytosquelette. Comme co-facteur de transcription, la β -caténine est activée pendant le développement précoce de l'embryon suite à l'activation de la voie de signalisation Wnt.

β-neurexine : protéine transmembranaire sur la membrane présynaptique de certaines synapses, qui interagit avec la protéine membranaire postsynaptique neuroligine pour promouvoir la différenciation fonctionnelle de la synapse.

Biologie du développement : discipline consacrée à l'étude du développement des organismes multicellulaires depuis leur origine à partir d'une cellule unique, le zygote, jusqu'à leur forme adulte.

Blastème : masse cellulaire se développant au niveau d'un site d'amputation. Dans le cas d'un membre d'amphibien, elle est formée à partir de la dédifférenciation et de la prolifération des cellules présentes sous l'épiderme lésé et est à l'origine de la patte régénérée.

Blastocœle : cavité remplie de liquide qui se forme à l'intérieur de la blastula.

Blastocœle primaire : cavité présente sous l'aire pellucide d'un blastoderme précoce de poulet.

Blastocyste : stade embryonnaire de mammifères correspondant à celui de blastula chez d'autres espèces animales, et qui est le stade où l'embryon s'implante dans la paroi utérine.

Blastoderme : désigne un embryon qui après la segmentation (ou clivage) se présente sous la forme d'une couche cellulaire et non sous celle d'une blastula sphérique, et que l'on observe chez les embryons précoces de poulet, poisson-zèbre et de drosophile.

Blastoderme syncytial : embryon précoce de drosophile chez lequel les divisions nucléaires après la fécondation ne s'accompagnent pas d'une cytodiérèse. L'embryon est à ce stade un blastoderme contenant, dans un cytoplasme unique, de nombreux noyaux localisés en position périphérique.

Blastodisque : autre nom désignant le blastoderme pour l'embryon de poulet.

Blastomères : nom donné aux cellules formées au cours de la segmentation (ou clivage).

Blastopore : invagination en forme de fente ou de cercle à la surface de l'embryon d'amphibien ou d'oursin, par laquelle les territoires à l'origine du mésoderme et de l'endoderme pénètrent à l'intérieur de l'embryon lors de la gastrulation.

Blastula : stade précoce du développement de certains embryons (d'amphibiens ou d'oursins, par exemple), à l'issue de la segmentation du zygote. La blastula est semblable à une balle creuse constituée d'une couche de cellules épithéliales délimitant une cavité remplie de liquide, le blastocœle.

Blocage de la polyspermie : mécanisme par lequel se trouve évité chez certaines espèces que la fécondation s'effectue par plus d'un

spermatozoïde. Chez les oursins et le xénope, il comporte deux étapes : un **blocage rapide** immédiat de nature électrique impliquant une dépolarisation de la membrane plasmique ovulaire, suivi d'un **blocage lent** dû à la formation d'une membrane de fécondation imperméable entourant l'œuf.

Boucle de rétroaction (ou **rétrocontrôle**) : type de régulation dans lequel le produit final d'une voie ou d'un processus peut inhiber (**boucle de rétroaction négative**) ou activer (**boucle de rétroaction positive**) sa propre production.

Bourgeon caudal : structure à l'extrémité postérieure des embryons de vertébrés contenant des cellules de type cellules souches qui seront à l'origine des structures post-anales de la queue. Désigne aussi le stade du développement d'un amphibien faisant suite au stade neurula.

Bourgeon dentaire (ou **placode dentaire**) : région spécifique de la lame dentaire qui se développera en une dent.

Bourgeons de membres : petites structures qui croissent sur le flanc des embryons de vertébrés et à partir desquelles se développent les membres.

Bourrelets endocardiaques : protubérances localisées de façon opposée sur la face interne de la paroi du tube cardiaque qui se transforment en cloisons divisant transversalement ce dernier en cavités auriculaire (atriale) et ventriculaire.

Brachial : se dit de la région du tronc d'un embryon de vertébrés au niveau de ses membres antérieurs.

Bulbe rachidien (ou **moelle allongée**) : composante de l'encéphale dérivant du myélencéphale (subdivision postérieure du rhombencéphale) et contenant de nombreux centres régulateurs de la vie végétative (battement cardiaque, respiration, pression sanguine).

Cadhérine : famille de molécules d'adhérence cellulaire importante pour le développement. Les cadhérines sont impliquées dans les jonctions adhérentes.

Cambium : anneau de tissu méristématique de l'appareil végétatif d'une plante qui forme de nouveaux tissus et augmente ainsi le diamètre de la tige ou de la racine.

Canaux de Müller : conduits qui courent le long des canaux de Wolff chez les embryons de mammifères et qui sont à l'origine du tractus génital femelle.

Canaux de Wolff : paire de canaux associés au mésonéphros des embryons de mammifères. Ils deviennent les canaux déférents chez les mâles.

Canaux déférents : paire de canaux qui relient les testicules produisant les spermatozoïdes au pénis.

Capacitation : maturation fonctionnelle du spermatozoïde se réalisant dans le tractus génital femelle.

Cardia bifida : désigne la formation de deux cœurs, situés chacun en position latérale. Observé chez le poisson-zèbre suite à une mutation, cet état résulte de la défaillance des cellules du croissant cardiaque à migrer pour former un cœur situé en position centrale.

Cardiomyocyte : cellule musculaire cardiaque mature complètement différenciée.

Cartilage de conjugaison : région cartilagineuse des os longs des vertébrés au niveau de laquelle se manifeste la croissance de l'os. Le cartilage s'accroît en taille et est finalement remplacé par de l'os *via* un processus d'ossification endochondrale.

Caspase : membre d'une famille de protéases intracellulaires dont certaines sont impliquées dans l'apoptose.

Caténines : protéines présentes au niveau des jonctions adhérentes où elles assurent la liaison entre les cadhérines et le cytosquelette. L'un des membres de cette famille, la β -caténine, agit également comme activateur transcriptionnel dans la voie canonique Wnt/ β -caténine.

Cellules d'amplification transitoire : cellules issues des cellules souches présentes dans les tissus en renouvellement continu, comme l'épiderme ou l'épithélium du tube digestif. Après plusieurs divisions rapides, elles se différencient dans le type cellulaire caractéristique du tissu.

Cellule de la glie radiaire : cellule allongée s'étendant dans toute l'épaisseur de la paroi du tube neural et constituant un support pour la migration des neurones.

Cellules de la ligne latérales : voir Primordium de la ligne latérale.

Cellules de la lignée germinale : cellules qui donnent naissance aux gamètes, ovules et spermatozoïdes.

Cellules des crêtes neurales : cellules caractéristiques des vertébrés provenant de la bordure de la plaque neurale formant les crêtes neurales. Suite à leur individualisation, elles migrent depuis la zone dorsale du tube neural vers différentes régions corporelles et donnent naissance à une large variété de tissus incluant les systèmes nerveux autonome et sensoriel, les cellules pigmentaires de la peau et certaines structures squelettiques de la tête.

Cellule endothéliale : type cellulaire formant l'endothélium qui borde les vaisseaux sanguins.

Cellules ES : voir Cellules souches embryonnaires.

Cellules folliculaires : voir Follicule.

Cellules fondatrices : (1) petit nombre de cellules dérivées du méristème apical donnant naissance à un organe de plante comme une fleur ou une feuille. (2) terme également donné aux cellules AB, C, D, E, MS et P4 à l'origine des diverses lignées cellulaires chez le nématode *C. elegans*.

Cellules germinales : cellules qui, chez un animal, sont à l'origine des ovules et des spermatozoïdes.

Cellules germinales primordiales : cellules précurseurs présentes dans l'embryon précoce dont seront issues les cellules germinales. Cellules gliales : *voir Glie.*

Cellule initiale : n'importe quelle cellule du méristème d'une plante capable de se diviser de façon continue et donnant à la fois naissance à des cellules en division destinées à rester dans le méristème et à des cellules quittant le méristème et entrant dans une voie de différenciation.

Cellules iPS : voir **Cellules souches pluripotentes induites**.

Cellule mère ganglionnaire : chez la drosophile, cellule formée par la division d'un neuroblaste et qui est à l'origine des neurones.

Cellules nourricières : chez la drosophile, cellules de la lignée germinale accompagnant l'ovocyte en cours de développement et qui synthétisent des protéines et des ARN qui sont déposés dans celui-ci.

Cellules polaires : cellules précurseurs des cellules germinales formées à l'extrémité postérieure du blastoderme de la drosophile.

Cellules polaires folliculaires : cellules des extrémités antérieure et postérieure d'une chambre ovarienne de drosophile. Elles interviennent dans la formation des attaches entre follicules et aident les ovocytes à être positionnés à l'extrémité postérieure des follicules.

Cellules satellites : cellules souches indifférenciées présentes dans le muscle adulte qui peuvent être activées en cas de lésion musculaire et produire de nouvelles cellules musculaires squelettiques.

Cellules somatiques : ensemble des cellules de l'organisme, à l'exception des cellules germinales. Chez la plupart des animaux, les cellules somatiques sont diploïdes.

Cellules souches : cellules indifférenciées pouvant à la fois s'autorenouveler et donner naissance à des types cellulaires différenciés. Les cellules souches sont observées dans la plupart des tissus adultes où elles peuvent contribuer à leur réparation. *Voir aussi Cellules souches embryonnaires*.

Cellules souches hématopoiétiques : cellules souches multipotentes dans la moelle osseuse des vertébrés à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines.

Cellules souches épiblastiques (ou **epiSCs** pour *epiblast Stem Cells*) : cellules souches dérivées de l'épiblaste d'un embryon de souris à un stade postérieur au blastocyste. Elles peuvent être maintenues indéfiniment en culture et se différencier en un large éventail de types cellulaires mais, contrairement aux cellules ES, elles ne donnent pas de chimères après injection dans un blastocyste-hôte.

Cellules souches embryonnaires (ou **cellules ES**) : cellules pluripotentes dérivées de la masse cellulaire interne d'un blastocyste de mammifère, qui peuvent être indéfiniment maintenues en culture. Injectées dans un blastocyste-hôte, elles s'intègrent à la masse cellulaire interne de ce dernier et peuvent potentiellement contribuer à tous les tissus de l'embryon.

Cellules souches mésenchymateuses : cellules dérivées de la moelle osseuse capables de se différencier en culture en un ensemble varié de types cellulaires comme les chondrocytes, les ostéoblastes et les adipocytes.

Cellules souches pluripotentes induites (ou **cellules iPS** pour *induced Pluripotent Stem cells*) : cellules souches obtenues par conversion de cellules somatiques différenciées sous l'effet de la transfection et de l'expression de quelques gènes de facteurs de transcription, qui induisent un retour de la cellule à un stade pluripotent.

Cellules stromales de la moelle osseuse : cellules de la moelle osseuse qui forment la niche servant de support et de maintien pour les cellules souches hématopoïétiques.

Cellule en état de différenciation terminale : décrit une cellule structurellement et fonctionnellement différenciée qui ne subira ultérieurement plus aucune étape de différenciation. Ces cellules ne présentent souvent plus d'activité mitotique.

Centre de Nieuwkoop : centre de signalisation localisé du côté dorsal de l'embryon précoce de xénope. Sa formation dans la région végétative dorsale de la blastula résulte de la rotation corticale, et lui permet de spécifier la position de l'organisateur de Spemann situé juste au-dessus de lui.

Centre quiescent : chez les plantes, groupe de cellules situées dans la partie centrale d'un méristème apical de tige et qui se divisent rarement, mais dont le rôle est essentiel dans le fonctionnement du méristème.

Centre de signalisation : région localisée de l'embryon qui exerce une influence particulière sur les cellules voisines, en général au moyen de protéines de signalisation sécrétées, et qui détermine ainsi comment ces cellules se développent.

Centrosome : centre organisateur principal des microtubules dans une cellule. Il se duplique avant la mitose ou la méiose, chaque centrosome fils formant une extrémité du fuseau de microtubules. Il comporte une paire de centrioles, dont l'un est à l'origine des corpuscules basaux des cils, y compris des cils primaires présents sur la plupart des cellules de vertébrés.

Cerveau antérieur (ou **prosencéphale**) : partie antérieure de l'encéphale embryonnaire des vertébrés qui donnera, après sa subdivision en télencéphale et diencéphale, les hémisphères cérébraux, le thalamus et l'hypothalamus.

Cerveau moyen (ou **mésencéphale**) : partie intermédiaire de l'encéphale embryonnaire des vertébrés qui donne dorsalement le toit optique (amphibiens et oiseaux) et des structures analogues chez les mammifères (*voir Toit optique*), et ventralement les pédoncules cérébraux.

Cerveau postérieur (ou **rhombencéphale**) : partie postérieure de l'encéphale embryonnaire qui après subdivision donnera le cervelet, le pont et le bulbe rachidien.

Cervelet : composante de l'encéphale de vertébrés dérivant de la partie dorsale du métencéphale (subdivision antérieure du rhombencéphale) et intervenant dans de nombreuses régulations de la motricité, dont le tonus musculaire et la posture qui sont indépendants d'un contrôle conscient.

Chambre auriculaire (ou **cavité atriale** ou **oreillette**) : l'une des deux cavités du tube cardiaque des vertébrés primitivement divisé par une cloison transversale, l'autre étant la chambre ventriculaire. Chez le poisson, le cœur ne possède que deux cavités ; les autres vertébrés ont un cœur à quatre cavités (oreillettes et ventricules, droit et gauche) résultant de la séparation longitudinale des deux cavités initiales.

Chambre ovarienne : structure correspondant à des follicules chez la drosophile femelle, constituée d'un ovocyte accompagné de ses cellules nourricières et entouré de cellules folliculaires.

Chambre ou **cavité ventriculaire** (ou **ventricule**) : l'une des deux cavités provenant du premier cloisonnement du tube cardiaque des vertébrés par une cloison transversale, l'autre étant la chambre atriale ou auriculaire (voir *ce terme*).

Champ cardiaque primaire : région du mésoderme splanchnique situé sous le repli céphalique, qui est constituée par les futures cellules cardiaques, et qui forme le croissant cardiaque dont les extrémités placées de chaque côté du corps vont à la rencontre l'une de l'autre pour former le tube cardiaque. Les cellules du croissant cardiaque sont les premières à se différencier en cellules musculaires cardiaques.

Champ cardiaque secondaire : désigne une deuxième lignée cellulaire à l'origine du cœur, exclusivement présente au niveau de la voie efférente. Les cellules résident en arrière du croissant cardiaque (le champ cardiaque primaire) dans le mésoderme pharyngien.

Chiasma optique : lieu où les fibres nerveuses issues du nerf optique droit croisent celles issues du nerf optique gauche en direction des centres de projection cérébraux (toit optique chez les amphibiens et le poulet, corps genouillé latéral chez les mammifères). Chez les mammifères, le chiasma optique est le lieu où les fibres provenant d'un œil se séparent, certaines allant vers le corps genouillé latéral controlatéral et les autres vers l'ipsilatéral.

Chimère : organisme ou tissu composé de cellules de deux ou plusieurs origines et ayant des constitutions génétiques différentes.

Chimère mériclinale : plante dans laquelle des cellules génétiquement différenciées donnent naissance à un secteur d'organe ou à la plante entière.
Chimère périclinale : chez les plantes, chimère au sein de laquelle une des trois couches du méristème possède un marqueur génétique qui la distingue des deux autres.

Chimioattractif : pouvoir qu'a une molécule d'attirer des cellules en migration.

Chimiorépulsif : pouvoir qu'a une molécule de repousser des cellules en migration.

ChIP-chip et ChIP-seq (ChIP pour *Chromatin Immuno*

Precipitation) : techniques pour déterminer quels sont les sites sur un chromosome où sont liées *in vivo* des protéines particulières. Elles consistent en une immunoprécipitation de fragments de chromatine par des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt suivie d'une analyse de l'ADN lié par puce à ADN (ChIP-chip) ou par un séquençage de l'ADN (ChIP-seq).

Chondrocyte : cellule cartilagineuse différenciée.

Chorde (ou **notochorde**) : structure squelettique transitoire sous la forme d'une tige cellulaire pleine s'étendant de la région céphalique à la queue, située en position médio-dorsale sous le tube neural des embryons de vertébrés. D'origine mésodermique, ses cellules sont au final incorporées à la colonne vertébrale.

Chorion : la plus externe des membranes extra-embryonnaires chez les reptiles, oiseaux et mammifères. Chez les reptiles et oiseaux, plaqué contre la coquille, il est impliqué dans les échanges respiratoires. Chez les mammifères, il contribue à la constitution du placenta et joue un rôle dans les apports nutritifs et l'élimination des déchets. Le chorion des œufs d'insectes, de nature totalement différente, exerce un rôle de protection.

Chromatine : matériel constitutif des chromosomes. La chromatine est constituée d'ADN compacté en nucléosomes par des protéines histones, et est aussi associée à beaucoup d'autres protéines, ces divers constituants conditionnant sa structure. Des modifications chimiques de l'ADN et des histones affectent la structure de la chromatine et déterminent si un gène donné peut être transcrit ou non selon son accessibilité. Des modifications de ce type sont dites épigénétiques et, à la différence des mutations, elles affectent l'expression génique sans modification de la séquence de l'ADN.

Chromosome polytène : chromosome géant formé par la réplication répétée de l'ADN en l'absence de division cellulaire, les brins d'ADN restant accolés les uns aux autres.

Chromosome sexuel : tout chromosome conditionnant le phénotype sexuel (par exemple, les chromosomes X et Y chez les mammifères).

Cil primaire : structure immobile microtubulaire retrouvée chez la plupart des cellules des vertébrés ; il constitue un site pour la signalisation Sonic hedgehog.

Ciliopathie : désigne de nombreux syndromes humains pouvant affecter des organes variés chez lesquels la fonction ciliaire est défectueuse. Certaines ciliopathies, comme le syndrome de Kartagener, révèlent à des degrés divers, une asymétrie gauche-droite anormale d'organes comme le foie ou le cœur (*situs inversus*).

Clivage (ou **segmentation**) : série de divisions cellulaires, souvent rapides et sans augmentation de taille des cellules (blastomères), ayant lieu après la fécondation et produisant un embryon constitué de nombreuses petites cellules.

Clivage radiaire (ou **segmentation radiaire**) : type de clivage au cours duquel les plans de division successifs sont perpendiculaires entre eux et les blastomères formés disposés juste les uns au-dessus des autres. **Clivage spiral** (ou **segmentation spirale**) : type de clivage typique des mollusques et des annélides dans lequel les plans de division successifs sont légèrement décalés, ce qui aboutit à une disposition en quinconce des blastomères.

Clonage : méthode par laquelle un individu génétiquement identique à un « parent » est produit par la transplantation d'un noyau d'une cellule somatique parentale dans un ovule non fécondé.

Clonage thérapeutique : utilisation potentielle de la technique du transfert de noyau de cellule somatique pour générer des embryons à partir desquels des cellules ES pourraient être produites. Le but de cette manipulation serait d'obtenir des cellules génétiquement identiques à celles d'un patient et à usage thérapeutique.

Clone : (1) population de cellules génétiquement identiques dérivées d'une cellule unique suite à des divisions successives. (2) descendant génétiquement identique d'un individu obtenu par reproduction asexuée ou par des techniques de clonage.

Co-activateur : protéine de régulation génique qui favorise l'expression d'un gène sans se fixer elle-même à l'ADN. Elle interagit avec des facteurs de transcription se liant à l'ADN et potentialise leur action activatrice.

Co-répresseur : protéine de régulation génique qui réprime l'expression d'un gène sans se fixer elle-même sur l'ADN. Elle agit en formant un complexe avec des facteurs de transcription se liant à l'ADN.

Code Hox : désigne les combinaisons des gènes Hox qui spécifient les différentes régions le long de l'axe antéro-postérieur corporel, ou de l'axe proximo-distal des membres.

Coiffe animale, pôle animal : voir Région animale.

Coiffe apicale épidermique : désigne l'épiderme qui recouvre la section d'un membre amputé d'amphibien. Sa formation est essentielle pour que se réalise la régénération.

Colinéarité : désigne la correspondance entre l'ordre des gènes Hox sur un chromosome et leur ordre d'expression spatiotemporelle chez l'embryon.

Colliculus supérieur : région du mésencéphale dorsal dans le cerveau adulte des mammifères recevant certaines des projections rétiniennes. Région analogue du toit optique des oiseaux et des amphibiens qui lui reçoit l'essentiel des projections rétiniennes.

Colonnes des dominances oculaires : colonnes de neurones dans le cortex visuel qui répondent à un même stimulus dans le champ visuel vu par l'œil droit et l'œil gauche.

Colonne motrice latérale : colonne longitudinale de motoneurones, présente sur chacun des côtés de la moelle épinière dans les régions brachiales et lombaires. Ses neurones innervent les membres antérieurs et postérieurs.

Colonne motrice médiane : colonne longitudinale de motoneurones s'étendant ventralement le long de la ligne médiane de la moelle épinière.

Colonne vertébrale : structure squelettique dorsale chez les vertébrés constituée d'une succession de vertèbres.

Compaction : désigne le phénomène se produisant à un stade précoce du clivage chez les mammifères au cours duquel les blastomères s'accolent les uns aux autres et leurs microvillosités sont progressivement confinées à la surface de l'embryon.

Compartiment : petite région embryonnaire qui recèle toutes les cellules issues d'un groupe réduit de cellules fondatrices et qui révèle

une restriction de lignage cellulaire. Ces cellules restent parfaitement confinées dans le périmètre imposé par la frontière du compartiment sans tenter de la traverser. Les compartiments sont assimilables à des unités propres de développement.

Compensation de dose : mécanisme qui permet, malgré un nombre différent de chromosomes X entre mâles et femelles, que le niveau d'expression des gènes portés sur le chromosome X soit le même dans les deux sexes. Les mammifères, insectes et nématodes présentent des mécanismes différents de compensation de dose.

Compétence : aptitude qu'a une cellule ou un tissu à répondre à un signal inducteur et qui ne se manifeste que pendant une période de temps limitée.

Complexe Antennapedia : groupe de gènes sélecteurs constituant l'un des deux complexes Hox (encore désigné complexe HOM-C) chez la drosophile.

Complexe bithorax : groupe de gènes sélecteurs constituant l'un des deux complexes Hox (encore désigné complexe HOM-C) chez la drosophile.

Complexe de remodelage de la chromatine : complexe enzymatique qui agit sur la chromatine en changeant sa conformation, ce qui modifie la capacité de l'ADN à être transcrit.

Complexe d'initiation de la transcription : complexe protéique constitué d'un ensemble de facteurs de transcription généraux et de l'ARN polymérase. Il s'assemble sur le promoteur et positionne l'ARN polymérase de façon correcte pour entamer la transcription.

Complexe génique (pour *gene cluster*) : groupe de gènes apparentés, étroitement rapprochés sur un même chromosome, qui généralement constitue une unité fonctionnelle. Exemple des complexes de gènes Hox chez les animaux, où l'expression séquentielle des gènes de chaque complexe spécifie des valeurs de position le long de l'axe antéro-postérieur.

Complexe HOM-C : nom encore donné aux groupes de gènes Hox chez la drosophile.

Complexes Hox : voir Gènes Hox.

Condensation : agglomération croissant de cellules pour former des structures comme les éléments cartilagineux à l'origine des os.

Cône de croissance : région à l'extrémité de l'axone en extension d'un neurone en développement. Le cône de croissance progresse sur le substrat et est sensible à son environnement grâce à des filopodes.

Contrainte de développement : processus de développement préexistant qui contraint l'évolution de nouvelles formes.

Controlatéral : qui se réfère au côté opposé du corps.

Convergence dorsale : chez le poisson-zèbre, migration individuelle de cellules mésodermiques depuis les régions latérales vers l'axe médian, pour former la chorde.

Coopérativité : processus par lequel la fixation d'un ligand sur un site d'une molécule (comme la fixation d'un facteur de transcription sur un site d'une molécule d'ADN) rend plus probable la fixation ultérieure d'autres ligands sur d'autres sites de la même molécule.

Corona radiata : assise de cellules somatiques folliculaires entourant l'ovocyte en cours de développement chez les mammifères, et qui l'accompagne lors de la ponte ovulaire.

Corps cellulaire (ou **péricaryon** ou **soma**) : partie d'un neurone contenant le noyau et à partir de laquelle sont émis l'axone et les dendrites.

Corps genouillé latéral : chez les mammifères, région paire du diencéphale recevant la majeure partie des axones du nerf optique.

Cortex : (1) couche cytoplasmique périphérique directement située sous la membrane plasmique des cellules animales, de consistance plus visqueuse que le reste du cytoplasme et qui est riche en actine et myosine. (2) portion de tige ou de racine située entre l'épiderme et les tissus vasculaires centraux d'une plante. (3) couche superficielle des hémisphères cérébraux et cérébelleux dans l'encéphale des reptiles, oiseaux et en particulier des mammifères (*voir Cortex cérébral*).

Cortex cérébral : ensemble des couches superficielles des hémisphères cérébraux se développant à partir du pallium du télencéphale, où siègent les centres de traitement les plus performants pour l'information sensorielle, le contrôle moteur, l'apprentissage et la mémoire chez l'adulte.

Cortex visuel : partie du cortex cérébral chez les mammifères où se projettent les signaux visuels issus du corps genouillé latéral, et où se fait le traitement conduisant à la perception visuelle.

Corticolibérine (ou CRH pour Corticotropin-Releasing

Hormone) : hormone peptidique libérée par des cellules neurosécrétrices hypothalamiques. Chez les amphibiens, en agissant sur l'hypophyse, elle provoque la libération de la thyréostimuline (TSH), ce qui entraîne une métamorphose.

Cotylédon : partie de l'embryon d'une plante remplissant le rôle d'organe de stockage de réserves nutritives.

Couche basale : couche la plus profonde de l'épiderme de la peau, qui contient les cellules souches à l'origine du renouvellement de l'épiderme.

Couche enveloppante : couche unicellulaire la plus externe du blastoderme de l'embryon précoce du poisson-zèbre, qui disparaît au cours du développement de l'embryon.

Couche profonde : couche constituée par une population de blastomères sous la couche enveloppante du blastoderme du poisson-zèbre et qui est à l'origine de l'embryon.

Couche syncytiale vitelline : chez les embryons du poisson-zèbre, couche cytoplasmique continue multinucléée et dépourvue de vitellus, localisée sous le blastoderme.

Crête apicale ectodermique (ou **AER** pour *Apical Ectodermal Ridge*) : épaississement de l'ectoderme à l'extrémité du bourgeon de membre du poulet et des mammifères, qui est essentiel pour la croissance et l'établissement de l'axe proximo-distal du membre.

Crêtes génitales : chez les vertébrés, régions de l'épithélium cœlomique dorsal à partir desquelles se développent les gonades.

Crêtes neurales : voir Cellules des crêtes neurales.

Crête neurale antérieure : centre de signalisation dans le cerveau en développement de l'embryon précoce. Localisé dans la partie la plus antérieure du prosencéphale et dans la région immédiatement adjacente, il est responsable de la mise en place du patron d'organisation du télencéphale (subdivision antérieure du prosencéphale à l'origine du cortex et des ganglions de la base).

Croissance : désigne une augmentation en taille pouvant être due à une multiplication cellulaire, un accroissement en taille des cellules ou un dépôt de matériel extracellulaire.

Croissance intercalaire : type de croissance qui se réalise chez des espèces présentant une régénération par épimorphose et qui se manifeste lorsque deux éléments tissulaires ayant des valeurs de position différentes sont situés l'un à côté de l'autre. La croissance intercalaire restitue les valeurs de position intermédiaires. **Croissance par accrétion :** augmentation de la masse d'un tissu (par exemple le cartilage ou l'os) due à la sécrétion cellulaire de grandes quantités d'éléments de la matrice extracellulaire, ce qui conduit à une augmentation du volume de l'espace extracellulaire.

Croissance par agrandissement cellulaire : croissance d'une structure ou d'un embryon par accroissement de la taille des cellules sans division de celles-ci. Ce type de croissance est commun chez les plantes.

Croissant cardiaque (ou **croissant cardiogénique**) : régions de précurseurs cellulaires cardiaques localisées de part et d'autre de l'axe du corps dans la splanchnopleure des lames latérales mésodermiques sous le repli céphalique.

Croissant de Koller : région en forme de croissant constituée de petites cellules et située à la frontière entre l'hypoblaste et la zone marginale postérieure du blastoderme de poulet.

Cycle cellulaire : séquence des événements par laquelle une cellule duplique son ADN et se divise en deux cellules filles.

Cycle vital : biologie d'un organisme ou d'une espèce considérée sous l'angle de sa stratégie reproductrice et de son écologie ou interaction avec l'environnement.

Cyclines : tous les membres d'une famille de protéines dont la concentration varie fortement pendant le cycle cellulaire et qui sont impliqués dans la progression des cellules dans ce cycle. Les cyclines agissent en se liant et en les activant aux protéines kinases cycline-dépendantes (Cdks).

Cyste germinal : chez la femelle adulte de drosophile, désigne l'ensemble de 16 cellules constitué de l'ovocyte et des cellules nourricières. Désigne également les structures présentes dans les testicules des vertébrés anamniotes et des insectes dans lesquelles se déroule la spermatogenèse.

Cytosquelette : réseau de protéines sous la forme de microfilaments, microtubules et filaments intermédiaires, donnant leurs formes aux cellules et permettant à celles-ci leurs mouvements. Il fournit également des supports pour le transport intracellulaire de matériel.

Dauer : stade larvaire de *Caenorhabditis elegans* apparaissant en cas d'un appauvrissement alimentaire et les larves concernées ne se nourrissent ni ne se développent jusqu'au moment où de la nourriture est de nouveau disponible.

Dédifférenciation : perte par une cellule différenciée de ses caractéristiques notamment structurales, ce qui peut conduire à sa différenciation en un autre type cellulaire.

Défaut du tube neural (ou **NTD** pour *Neural Tube Defect*) : toute anomalie congénitale due à un défaut local de fermeture du tube neural, comme le *spina bifida*.

Délamination : dédoublement d'un feuillet embryonnaire en deux couches cellulaires différentes par suite d'une séparation ou d'une migration des cellules. Ce type de mouvement morphogénétique s'observe par exemple au niveau de la ligne primitive chez l'embryon de poulet.

Dendrite : extension du corps d'un neurone par laquelle sont reçus les stimuli en provenance d'autres cellules nerveuses.

Denticules : fines structures saillantes et semblables à de « petites dents » présentes sur la cuticule des larves d'insectes.

Derme : couche de tissu conjonctif de la peau, située sous l'épiderme dont elle est séparée par une lame basale.

Dermomyotome : région somitique à l'origine à la fois des muscles et du derme.

Desmosome : type de jonction d'adhérence cellule/cellule dans laquelle les molécules d'adhérence de type cadhérines interagissent côté intracellulaire avec les filaments intermédiaires de kératine.

Destinée (ou **devenir**) : ce vers quoi se développe normalement une cellule. Avoir une destinée particulière ne signifie pas cependant que la cellule ne puisse pas évoluer différemment, si elle est placée dans un autre environnement.

Déterminants cytoplasmiques : nom donné à des facteurs cytoplasmiques (par exemple ARNm ou protéines) dans le zygote ou les cellules embryonnaires qui, en étant distribués de manière inégale dans les cellules filles issues d'une division asymétrique, peuvent influencer le devenir des cellules qui les contiennent et conférer à celles-ci des destinées différentes. C'est le cas des facteurs maternels.

Détermination : changement d'état d'une cellule faisant que sa destinée est désormais fixée, déterminée. Une cellule déterminée poursuivra cette destinée même greffée de manière ectopique dans l'embryon.

Détermination du sexe : ensemble des processus génétiques et du développement par lequel le sexe d'un organisme est spécifié.

Deutérostomiens : une des deux lignées d'animaux bilatériens, incluant notamment les chordés et les échinodermes, caractérisée par un clivage radiaire de l'œuf fécondé et la formation de l'anus à partir du blastopore, la bouche se formant secondairement.

Développement à bandelette germinative courte : type de développement chez l'insecte au cours duquel le blastoderme embryonnaire ne forme que les segments antérieurs de l'embryon tandis que les segments restants sont ajoutés progressivement au cours de la croissance.

Développement à bandelette germinative longue : type de développement chez l'insecte au cours duquel le blastoderme embryonnaire formera l'embryon dans son intégralité, comme chez la drosophile.

Diagnostic génétique préimplantatoire : moyen de déterminer le génotype d'embryons produits par FIV, sans léser l'embryon, avant de procéder à une implantation. Son utilisation est préconisée s'il existe un risque que l'embryon soit porteur d'une mutation causant une maladie génétique. Un blastomère est prélevé d'un embryon en cours de segmentation *in vitro*, ce qui n'affecte pas son développement ultérieur. L'ADN de ce blastomère peut être ensuite amplifié et testé pour établir la présence ou non d'une mutation.

Différenciation cellulaire : processus par lequel les cellules deviennent fonctionnellement et structurellement différentes les unes des autres. La différenciation cellulaire génère des types cellulaires distincts, comme les cellules musculaires ou les cellules sanguines.

Dilatation dirigée : extension par ses deux extrémités d'une structure en forme de tube, provoquée par une pression hydrostatique, la direction de l'extension traduisant l'existence d'une résistance périphérique importante.

Diploblastiques : qualifie les animaux présentant seulement deux feuillets embryonnaires (endoderme et ectoderme), comme par exemple les cnidaires (hydre, méduses...).

Diploïde : qualifie l'état d'une cellule contenant deux lots de chromosomes homologues, un de chaque parent, et ainsi possédant deux copies de chaque gène.

Disques imaginaux : petits sacs épithéliaux présents chez la larve de drosophile ou d'autres insectes et qui donneront à la métamorphose des structures adultes comme les ailes, les pattes, les antennes, les yeux, et les organes génitaux.

Distal : correspond à l'extrémité d'une structure, tel qu'un membre, ce terme désignant dans ce cas, la partie la plus éloignée de leur attache au corps.

Division asymétrique : division cellulaire donnant deux cellules filles différentes, en particulier parce que des déterminants cytoplasmiques ont été distribués de façon non équivalente entre ces cellules filles.

Division symétrique : division cellulaire donnant deux cellules filles identiques et ayant la même destinée.

Dominance apicale : phénomène chez les plantes empêchant les bourgeons axillaires, insérés sur des nœuds situés sous l'apex d'une tige, de former des tiges secondaires quand cet apex est intact. Il est dû à la production d'auxine par l'apex.

Dominance postérieure (ou **prévalence postérieure**) : correspond au fait que l'action de gènes Hox s'exprimant antérieurement peut être inhibée par des gènes Hox s'exprimant plus postérieurement quand ils sont amenés à s'exprimer dans la même région.

Dominant : se dit d'un allèle qui détermine le phénotype, même en étant présent en une seule copie.

Dominant-négatif : désigne une mutation qui inactive une fonction cellulaire par la production d'un ARN défectueux ou d'une protéine qui bloque la fonction du produit du gène.

Ecdysone : hormone stéroïdienne qui est responsable chez les insectes de l'initiation des mues dont celle nymphale et de la métamorphose.

Ectoderme : feuillet embryonnaire à l'origine de l'épiderme et du système nerveux.

Ectoderme dorsal : chez la drosophile, une des quatre régions principales qui subdivisent, selon l'axe dorso-ventral, l'embryon avant la gastrulation. Cette région est à l'origine de l'épiderme.

Ectoderme extra-embryonnaire : tissu embryonnaire contribuant à la formation des annexes embryonnaires, amnios et allantoïde, ainsi que le placenta chez les mammifères.

Ectoderme ventral : une des quatre régions principales qui subdivisent, selon l'axe dorso-ventral, l'embryon de drosophile avant la gastrulation. Cette région est à l'origine du système nerveux et d'une partie de l'épiderme.

Ectomésenchyme : cellules d'origine neuroectodermique (crêtes neurales) à l'origine d'os et cartilages céphaliques ainsi que du tissu conjonctif de la face.

Ecusson : nom donné à la région présentant une forme d'écusson qui correspond à celle de l'organisateur chez les embryons des poissons-zèbres.

Effet de communauté : phénomène par lequel l'induction d'une différenciation cellulaire dans certains tissus dépend de la présence d'un nombre suffisant de cellules susceptibles de répondre aux signaux inducteurs.

Électroporation : technique d'introduction d'un ADN dans les cellules d'une petite région d'un embryon en soumettant celle-ci à un courant électrique pulsé délivré par de fines électrodes, ce qui rend les membranes des cellules voisines plus perméables à la pénétration de l'ADN.

Élément P : élément transposable d'ADN trouvé chez la drosophile. C'est une courte séquence d'ADN pouvant s'insérer dans divers endroits d'un chromosome et qui peut également se déplacer d'un chromosome à l'autre. Cette propriété a été utilisée dans la technique dite de transformation *via* l'élément P pour constituer des mouches transgéniques. **Embryogenèse :** désigne l'ensemble des processus du développement embryonnaire depuis l'œuf fécondé.

Embryons « dorsalisés » : désigne des embryons dont les régions dorsales se sont développées aux dépens des régions ventrales à la suite de manipulations expérimentales.

Embryons « ventralisés » : se dit d'embryons sans région dorsale et avec une région ventrale élargie.

Empreinte (ou **empreinte génomique**) : processus par lequel certains gènes sont éteints dans l'ovule ou le spermatozoïde au cours de leur différenciation et qui le restent dans le génome de l'embryon précoce. Cette empreinte se réalise durant la formation des gamètes et est probablement causée par une méthylation différentielle de l'ADN des gènes au cours de la gamétogenèse.

Endoblaste : chez l'embryon de poulet, feuillet cellulaire qui se développe avant la formation de la ligne primitive, à partir de la zone marginale postérieure et qui remplace l'hypoblaste sous-jacent à l'épiblaste.

Endocarde : tissu tapissant les cavités cardiaques qui est constitué par un endothélium recouvrant une couche de tissu conjonctif.

Endoderme : (1) feuillet embryonnaire donnant naissance, chez les vertébrés, à l'épithélium fonctionnel du tube digestif et aux organes associés tel le foie, ainsi qu'aux poumons. (2) couche de tissu cortical de la racine des plantes, située à l'extérieur de la zone qui héberge les tissus conducteurs.

Endoderme primitif : chez les embryons de mammifères, structure issue de la masse cellulaire interne, qui participe à la formation de feuillets extra-embryonnaires.

Endoderme viscéral : feuillet dérivant de l'endoderme primitif et qui se développe à la surface de l'œuf-cylindre des mammifères.

Endoderme viscéral antérieur (EVA) : feuillet extra-embryonnaire chez l'embryon précoce de souris qui est impliqué dans l'induction des régions antérieures embryonnaires.

Endoderme viscéral distal (EVD) : feuillet d'endoderme localisé à l'extrémité distale de l'épiblaste en forme de cupule de souris, et qui en progressant depuis la région postérieure de l'embryon, devient l'endoderme viscéral antérieur (EVA).

Endomésoderme (ou **mésoendoderme**) : tissu embryonnaire produisant à la fois de l'endoderme et du mésoderme.

Endosperme : tissu nourricier présent dans les graines des gymnospermes servant de source nutritive pour l'embryon. [Il est à noter que le même terme *endosperm* est généralement employé dans la littérature étrangère pour désigner les deux types de tissus de réserve, albumen et endosperme, indépendamment de leur origine (NdT)].

Endothélium : épithélium délimitant les vaisseaux sanguins.

Enhancer (ou **amplificateur**) : site de la zone de contrôle d'un gène, en particulier tissu-spécifique, sur lequel se fixent des protéines activatrices, ce qui active ce gène.

Enhancer-trap : technique utilisée chez la drosophile pour faire exprimer un gène spécifique dans un tissu particulier ou à un stade donné du développement.

Entre-noeud : portion de la tige d'une plante située entre deux nœuds successifs, sites au niveau desquels les feuilles se forment.

Eph : récepteur protéique membranaire d'une protéine éphrine. Les interactions des éphrines avec leurs récepteurs sont à l'origine de la répulsion ou de l'attraction et de l'adhérence des cellules, et sont

impliquées, par exemple, dans la délimitation des compartiments des rhombomères et dans le guidage axonal.

Éphrines : ligands des récepteurs Eph, répartis en deux classes A et B (voir *Eph*).

Épiblaste : chez les embryons de souris et de poulet, population cellulaire respectivement du blastocyste et du blastoderme, à l'origine de l'embryon lui-même. Chez la souris, il se développe à partir des cellules de la masse cellulaire interne.

Épibolie : processus de recouvrement de l'ensemble de l'embryon par l'ectoderme au cours de la gastrulation.

Épicarde : enveloppe cardiaque externe recouvrant la couche musculaire du cœur.

Épiderme : chez les vertébrés et les plantes, couche externe de cellules constituant l'interface entre l'organisme et son environnement. Sa structure varie beaucoup en fonction des organismes.

Épiderme interfolliculaire : épiderme situé entre les follicules pileux.

Épigénétique : décrit des mécanismes de régulation génique impliquant une modification de la chromatine, par exemple par la méthylation de l'ADN ou des histones, ou par l'acétylation d'histones.

Épimorphose : mode de régénération par lequel les structures régénérées se forment par le jeu d'une croissance nouvelle.

epiSCs : voir Cellules souches de l'épiblaste.

Épissage alternatif : processus qui permet à partir d'une séquence génique unique d'obtenir des formes alternatives d'ARN messager *via* différents épissages.

Épithélium : assise de cellules étroitement jointives les unes aux autres grâce à des jonctions d'adhérence.

Équivalence génétique : le fait que toutes les cellules somatiques d'un organisme multicellulaire contiennent les mêmes gènes.

Espace périvitellin : espace qui sépare la membrane plasmique d'un œuf fécondé de la membrane de fécondation.

Euchromatine : état de la chromatine sous lequel est rendue possible la transcription des gènes.

EVA : voir Endoderme viscéral antérieur.

Evagination : protrusion à la surface d'une structure, d'un organe ou du corps, formant une poche ou un tube vers l'extérieur.

Evo-dévo : terme informel désignant l'étude associant évolution et développement *via* la génétique du développement, l'embryologie, l'anatomie et la paléontologie.

Évolution convergente : évolution dans deux différents lignages ou populations qui de manière indépendante produit le même résultat.

Expression génique : processus incluant l'activation d'un gène et une transcription produisant au final un ARN ou une protéine fonctionnelle après traduction. La transcription d'un gène peut être détectée par hybridation *in situ* d'un acide nucléique, alors que la production de la protéine est révélée par immunomarquage.

Expression génique différentielle : activation ou extinction de gènes variés dans différentes cellules d'un organisme multicellulaire, générant ainsi des cellules aux propriétés fonctionnelles distinctes lors du développement.

Extension convergente : processus par lequel une couche de cellule change de forme en s'étendant dans une direction et en se rétrécissant dans la direction perpendiculaire à l'extension. L'extension convergente est causée par l'intercalation des cellules entre elles. Elle contribue, par exemple, à l'élongation de la chorde et du corps chez les embryons d'amphibien et de poisson-zèbre, et à l'extension de la bandelette germinative chez l'embryon de drosophile.

Extension de la bandelette germinative : correspond à l'extension de la bandelette germinative de la drosophile vers l'arrière et dorsalement qui se produit pendant la gastrulation. La bandelette germinative se rétracte ensuite avec l'achèvement du développement embryonnaire.

Extinction génique (ou *Knockdown* d'un gène) : blocage de l'expression d'un gène (ou d'un ensemble de gènes) par des modifications épigénétiques de la chromatine, par des microARN ou par interférence à ARN. À la différence d'un *knock-out*, l'extinction n'affecte pas la structure du gène lui-même, mais empêche la transcription ou la traduction d'un ARNm.

Facteurs de croissance hématopoïétique : ensemble hétérogène de protéines de signalisation sécrétées capables d'induire la différenciation des progéniteurs des cellules sanguines en cellules sanguines de types variés.

Facteurs de croissance du type insuline 1 et 2 (ou **IGF-1 et 2 pour** *Insulin-like Growth Factors 1 and 2***) : facteurs de croissance polypeptidiques qui stimulent la division cellulaire dans les embryons précoces et qui, après la naissance, interviennent dans beaucoup des effets de l'hormone de croissance et sont essentiels à la croissance post-natale chez les mammifères.**

Facteur de différenciation : toute molécule de signalisation extracellulaire qui promeut la différenciation cellulaire.

Facteur dorsalisant : protéine ou ARN qui promeut, dans un embryon précoce de vertébré, la formation de structures dorsales, comme c'est le cas des constituants maternels de la voie de signalisation Wnt chez le xénope.

Facteurs maternels : protéines ou ARN déposés dans l'œuf par l'organisme maternel pendant l'ovogenèse. La production de ces facteurs dépend de l'information génétique contenue dans le génome de la mère.

Facteur neurotrophique (ou **neurotrophine**) : terme général donné aux protéines nécessaires à la survie des neurones, comme le facteur de croissance nerveuse.

Facteur de réponse à l'auxine ou FRA (ou ARF pour *Auxin-Responsive Factor*) : activateur transcriptionnel se liant à l'ADN (ou dans quelques cas, répresseur) au niveau des éléments de réponse à l'auxine dans les régions de contrôle des gènes de réponse à l'auxine.

Facteur stimulateur de colonies (ou **CSF** pour *colony-stimulating factors*) : toute protéine qui favorise la différenciation des cellules sanguines.

Facteur stimulateur de colonies de granulocytes (ou **G-CSF** pour *Granulocyte Colony Stimulating Factor*) : facteur de croissance hématopoïétique qui favorise la différenciation des granulocytes à partir d'un progéniteur granulocyte-monocyte/macrophage.

Facteur stimulateur de colonies de granulocyte-macrophages (ou GM-CSF pour *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) : facteur de croissance hématopoïétique nécessaire au développement de la plupart des cellules myéloïdes à partir de leurs progéniteurs.

Facteur stimulateur de colonies de macrophages (ou M-CSF pour *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) : facteur de croissance

hématopoïétique qui favorise la différenciation des macrophages à partir du progéniteur granulocyte/macrophage.

Facteur de transcription : protéine nécessaire pour initier ou réguler la transcription d'un gène. Les facteurs de transcription agissent dans le noyau en se fixant à des sites spécifiques de la région régulatrice du gène.

Facteur général de transcription : protéine de régulation génique impliquée dans l'expression de nombreux gènes différents. Ces facteurs de transcription forment en partie le complexe d'initiation de la transcription ; ils se lient à l'ARN polymérase et la positionnent correctement sur l'ADN pour commencer la transcription.

Fente synaptique : espace réduit, au niveau de la synapse, entre la membrane de la cellule transmetteuse et celle de la cellule réceptrice.

Fermeture dorsale : chez la drosophile, rapprochement au-dessus de l'amnioséreuse, puis fusion le long de l'axe médian de l'embryon, des deux bords de l'épiderme dorsal.

Fermeture ventrale : rapprochement suivi d'une fusion ventrale, des deux côtés corporels de l'embryon de poulet ou de mammifère, conduisant à la formation du tube digestif.

Fermeture du tube neural : pendant la neurulation, rapprochement et fusion des extrémités dorsales des replis neuraux pour former le tube neural.

Feuillets embryonnaires : assises cellulaires mises en place au cours de la gastrulation qui donneront naissance à l'ensemble des tissus et organes. La plupart des animaux présentent trois feuillets, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme.

Fécondation : fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule conduisant à la formation d'un zygote.

Fibre musculaire : cellule musculaire totalement différenciée. Cette cellule multinucléée produit des protéines spécifiques des muscles comme l'actine et la myosine musculaires qui permettent la contraction de la cellule musculaire.

Filament d'actine (ou **microfilament**) : l'un des trois types principaux de filaments protéiques du cytosquelette. Les filaments d'actine (diamètre 7 nm) sont impliqués dans les mouvements et les modifications morphologiques cellulaires. Ils font notamment partie de l'appareil contractile des cellules musculaires.

Filament intermédiaire : l'un des trois types principaux de filaments protéiques du cytosquelette. Les filaments intermédiaires (diamètre 11 nm) sont impliqués dans la résistance de tissus comme les épithéliums.

File cellulaire : dans la racine d'une plante, colonne verticale de cellules toutes issues de la même cellule initiale du méristème racinaire.

Fœtus : chez l'espèce humaine, nom donné à l'embryon humain au-delà de la 8^e semaine de gestation.

Follicules : structure cellulaire présente dans l'ovaire de vertébrés, constituée d'une cellule germinale associée à des cellules somatiques (cellules folliculaires). Chez la drosophile, les cellules folliculaires en entourant l'ovocyte et les cellules nourricières, forment une chambre ovarienne assimilable à un follicule.

Formation corporelle primaire : chez les embryons d'oiseaux et de mammifères, désigne la formation de la tête et du tronc.

Formation corporelle secondaire : désigne chez les embryons d'oiseaux et de la souris, la formation de la partie corporelle la plus postérieure s'effectuant à partir du bourgeon caudal. **Fuseau mitotique** (ou **de division**) : ensemble de microtubules, présent dans les cellules en division et assurant la répartition des chromosomes dans les cellules filles.

Gamètes : cellules correspondant aux ovules ou aux spermatozoïdes qui transportent les gènes de la génération future, et qui en fusionnant lors d'une fécondation forment un zygote.

Gastrula : stade du développement animal se caractérisant par la pénétration des cellules des futurs mésoderme et endoderme et la mise en place de ces derniers à l'intérieur de l'embryon.

Gastrulation : étape du développement animal au cours de laquelle des mouvements cellulaires en surface et en profondeur (mouvements morphogénétiques) permettent la mise en place des feuillets embryonnaires dont l'agencement final préfigure le plan d'organisation générale corporel de l'individu.

Gènes à effet maternel : voir Mutation à effet maternel.

Gènes à homéoboîte : voir Homéoboîte.

Gènes de l'identité méristématique : chez les plantes, gènes responsables de la spécification de l'identité végétative ou inflorescentielle d'un méristème.

Gène de l'identité d'organe floral : un des nombreux gènes de plante responsables de l'identité individuelle des différentes parties de la fleur (pétales, étamines par exemple).

Gène de réponse à l'auxine : n'importe quel gène dont l'expression est contrôlée par l'hormone végétale auxine.

Gènes de polarité segmentaire : groupe de gènes impliqués, chez la drosophile, dans la stabilisation des parasegments et l'établissement des segments.

Gène du développement : désigne tout gène qui contrôle de façon spécifique un processus du développement.

Gène gain de fonction (ou *Knock-in* **d'un gène**) : introduction d'un nouveau gène fonctionnel dans un génome en employant des techniques impliquant une recombinaison homologue et une transgenèse.

Gènes *gap* : ensemble de gènes zygotiques codant des facteurs de transcription exprimés au cours du développement précoce de la drosophile et qui subdivisent l'embryon en larges régions le long de l'axe antéro-postérieur.

Gène homéotique : gène qui lorsqu'il est muté peut produire une transformation homéotique. Tel est le cas des gènes Hox.

Gènes homologues : gènes chez des espèces différentes partageant une similarité significative dans la séquence de leurs nucléotides et dérivant d'un gène ancestral commun.

Gènes Hox : famille de gènes à homéoboîte présents chez tous les animaux à l'exception, semble-t-il, des éponges, et impliqués dans la différenciation de l'axe antéro-postérieur. Chez beaucoup d'animaux, ils sont regroupés sur les chromosomes en un ou plusieurs complexes géniques. L'expression combinée des gènes Hox caractérise différentes régions ou structures suivant l'axe antéro-postérieur ou un axe proximo-distal.

Gène maternel : de manière générale, désigne tout gène hérité de la mère. *Voir aussi Gène à effet maternel*.

Gènes *pair-rule* : gènes impliqués chez la drosophile dans la délimitation des parasegments. Chacun d'eux s'exprime dans le blastoderme sous forme d'une alternance de bandes transversales correspondant à des parasegments.

Gènes paralogues : gènes qui chez une espèce proviennent de duplications à partir d'un même gène ancestral et ont subi des

divergences. C'est le cas des gènes Hox des vertébrés qui comportent plusieurs sous-groupes de gènes paralogues.

Gènes Pax : famille de gènes qui codent des protéines régulatrices de la transcription contenant un motif protéique *paired* et un homéodomaine pouvant être, selon le facteur, entier, tronqué, voire absent.

Gène proneural : gène permettant à une cellule du neuroectoderme de s'orienter vers une destinée neurale.

Gène régulateur maître : gène codant généralement un facteur de transcription, dont l'expression est nécessaire et suffisante pour déclencher l'activation de nombreux autres gènes impliqués dans un programme spécifique assurant la mise en place d'un type cellulaire, d'un tissu ou d'un organe spécifique.

Gène sélecteur : gène dont l'expression détermine le comportement ou les propriétés d'un groupe de cellules, et dont l'expression permanente est nécessaire pour maintenir ce comportement.

Gènes sélecteurs homéotiques : gènes de la drosophile qui spécifient l'identité et la voie de développement d'un groupe de cellules. Ils codent des facteurs de transcription et agissent en contrôlant l'expression d'autres gènes. Leur expression est nécessaire tout au long du développement. Les gènes Hox chez la drosophile sont des exemples de gènes sélecteurs homéotiques.

Gène suppresseur de tumeur : gène qui conduit une cellule à devenir cancéreuse quand les deux copies de ce gène sont inactivées. Dans les cellules normales, ce type de gène contrôle négativement la prolifération cellulaire.

Gènes zygotiques : tout gène présent dans l'œuf fécondé et s'exprimant à partir du génome de l'embryon.

Génétique inverse : approche de l'analyse génétique qui débute par la séquence nucléotidique d'un gène ou la séquence des acides aminés d'une protéine, et utilise ensuite cette information pour déterminer la fonction du gène.

Génome : désigne l'information génétique d'un organisme portée par l'ensemble de ses gènes et incluant les séquences d'ADN non codantes.

Génotype : constitution génétique précise d'une cellule ou d'un organisme en termes d'allèles présents pour chacun des gènes.

Germarium : région terminale d'un ovariole d'une femelle adulte de drosophile contenant des cellules souches dont l'évolution sera à l'origine de follicules (chambres ovariennes), chacun d'eux contenant un ovocyte.

Germe dentaire : structure mésenchymateuse constituant l'ébauche de l'organe dentaire.

Glie, cellules gliales : cellules non neuronales du système nerveux, les astrocytes et oligodendrocytes du système nerveux central et les cellules de Schwann du système nerveux périphérique.

Globules polaires : petites cellules formées au cours de la méiose lors de l'ovogenèse, qui ne prennent pas part à un développement embryonnaire.

Glycosylation : addition de chaînes carbohydratées sur une molécule, modification courante s'effectuant sur des protéines membranaires et extracellulaires après leur traduction.

Gonades : organes reproducteurs chez les espèces animales. Les gonades sont les ovaires chez les femelles et les testicules chez les mâles.

Gonadolibérine (ou GnRH pour Gonadotropin-Releasing

Hormone) : hormone peptidique sécrétée par l'hypothalamus et qui stimule l'hypophyse à produire les gonadotrophines, celles-ci augmentant la production des hormones sexuelles stéroïdiennes à la puberté.

Gouttière neurale : lors de la formation du tube neural, dépression longitudinale de la plaque neurale encadrée par les deux replis neuraux.

Granules corticaux : granules présents dans la zone corticale de certains œufs, dont le contenu, libéré au moment de la fécondation, participe à la formation de la membrane de fécondation.

Granules P : granules qui se localisent à l'extrémité postérieure du zygote de *Caenorhabditis elegans*, conférant aux cellules qui les contiennent une destinée germinale.

Gynogénotes : embryons chez lesquels les deux lots de chromosomes homologues sont d'origine maternelle.

Haploïdes : se dit de cellules ou d'organismes dont les cellules ne contiennent qu'un seul lot de chromosomes et qui sont issues de cellules diploïdes ayant subi une méiose. Chez la plupart des animaux les seules cellules haploïdes sont les gamètes, les spermatozoïdes ou les ovules.

Hedgehog : protéine de signalisation secrétée et caractérisée initialement chez la drosophile. Cette protéine est un des représentants d'une famille importante de molécules de signalisation du développement qui comprend Sonic hedgehog chez les vertébrés.

Hématopoïèse : désigne la formation des cellules sanguines à partir d'une cellule souche multipotente. Chez les vertébrés adultes, celle-ci se situe principalement dans la moelle osseuse.

Hémidesmosome : type de jonction d'adhérence cellule/matrice extracellulaire. Des intégrines membranaires se lient à des protéines matricielles telles que la laminine.

Hermaphrodite : organisme qui possède des gonades mâle et femelle et qui produit des gamètes des deux sexes.

Hétérochromatine : chromatine sous un état condensé ne permettant pas une transcription de l'ADN.

Hétérochronie : changement évolutif dans la chronologie des événements formant le développement. Une mutation qui modifie le cours du développement est appelée mutation hétérochronique.

Hétérozygote : décrit l'état dans lequel un organisme diploïde porte deux allèles différents pour un gène donné, chacun d'eux étant hérité de l'un des parents.

Histone : membre d'une famille de protéines assurant le premier niveau de compaction de l'ADN au sein de la chromatine. Des modifications chimiques des histones affectent l'aptitude de l'ADN à être transcrit au sein de la chromatine modifiée.

Homéoboîte : courte région d'ADN dans certains gènes qui code un domaine de liaison à l'ADN appelé homéodomaine. Les gènes possédant ce motif sont appelés gènes à homéoboîte ou homéogènes. Un homéodomaine est présent chez un grand nombre de facteurs de transcription importants pour le développement, comme par exemple Bicoïd, certaines protéines Pax ou les produits des gènes Hox.

Homéodomaine : voir Homéoboîte.

Homéose : phénomène par lequel, suite à une mutation, une structure est transformée en une autre. Un exemple d'une transformation homéotique est, chez la drosophile, le cas du développement d'une patte à la place d'une antenne consécutivement à une mutation.

Homologie : similitude morphologique ou structurale dérivée d'un ancêtre commun.

Homozygote : décrit l'état dans lequel un organisme diploïde possède, pour un gène donné, deux allèles identiques.

Horloge circadienne : horloge interne présente chez les organismes vivants qui entraîne des variations régulières des processus métaboliques et physiologiques, dont l'expression de certains gènes, au cours des 24 h de la durée d'un jour.

Hormone anti-müllérienne (ou **AMH** pour *Anti-Müllerian Hormone*) : protéine sécrétée par les testicules en cours de développement qui induit la régression des canaux de Müller chez les mâles.

Hormone de croissance (ou **GH** pour *Growth Hormone*) : hormone polypeptidique produite par l'antéhypophyse qui est essentielle pour la croissance post-embryonnaire chez les mammifères.

Hormone juvénile (ou JH pour *Juvenile Hormone*) : hormone produite par les *corpora allata* chez les insectes qui maintient l'état larvaire et empêche une métamorphose prématurée, celle-ci survenant à la suite d'une chute du taux de cette hormone.

Hormone prothoracotrope (ou PTTH pour *Prothoracicotropic Hormone*) : hormone peptidique produite par le cerveau des insectes qui provoque la sécrétion de l'ecdysone, et donc l'initiation de la mue nymphale ainsi que celle de la métamorphose.

Hormone thyréostimulante ou thyréostimuline (ou *TSH* pour *Thyroid-Stimulating Hormone*) : hormone sécrétée par l'antéhypophyse qui agit sur la thyroïde en stimulant la production des hormones thyroïdiennes.

Hormones thyroïdiennes : la tétraiodothyronine ou T4 (aussi appelée thyroxine) et la tri-iodothyronine (T3), produites par la glande thyroïde, sont requises de manière générale pour la croissance et stimulent le déclenchement de la métamorphose chez les amphibiens comme le xénope.

Hybridation *in situ* : technique permettant de visualiser sur une coupe histologique d'un tissu où des gènes particuliers sont transcrits. Les ARNm sont détectés en les hybridant avec une sonde ADN monobrin complémentaire marquée.

Hypoblaste : couche cellulaire présente chez l'embryon précoce de poulet qui, sous le blastoderme, recouvre le vitellus et qui donne naissance à des structures extra-embryonnaires telles que le pédicule vitellin.

Hypocotyle : partie de la tige de la plantule qui se développe à partir de la région située entre la racine embryonnaire et la future tige.

Hypoderme : nom donné à l'épiderme des nématodes, et de façon plus générale à celui d'espèces présentant une cuticule [NdT].

Hypophyse : (1) chez les plantes, cellule de certains embryons issue du suspenseur et participant à la formation du méristème racinaire embryonnaire et de la coiffe racinaire. (2) glande endocrine de vertébré située au plancher de l'encéphale et dont le fonctionnement est sous contrôle de l'hypothalamus.

Hypothalamus : région cérébrale se développant à partir de la base du diencéphale. Il contient les neurones sécrétoires produisant et sécrétant des neurohormones peptidiques dont certaines agissent comme facteurs modulant la fonction de l'hypophyse antérieure. C'est le cas de la somatolibérine (GH-RH) qui stimule la libération de l'hormone hypophysaire correspondante, l'hormone de croissance.

Hypothèse d'adhérence différentielle : hypothèse expliquant le mouvement de cellules dans l'embryon au cours du développement, par exemple lors de la gastrulation, par des différences de force d'adhérence entre différents types de cellules.

Hypothèse de la chimioaffinité : hypothèse selon laquelle chaque neurone (par exemple de la rétine) porte un marqueur chimique qui

lui permet de se connecter de façon fiable à une cellule marquée de façon appropriée (par exemple dans le toit optique).

IGF : voir Facteurs de croissance du type insuline 1 et 2.

Immigration (ou *ingression*) : mouvement de migration individuelle de cellules depuis un feuillet superficiel vers l'intérieur de l'embryon au cours de la gastrulation. Ce type de comportement cellulaire s'observe chez l'oursin avec l'individualisation des cellules à l'origine du mésenchyme primaire.

Immunoglobulines (Superfamille des) : grande famille de molécules caractérisées par la présence de domaines de type immunoglobuline, et dont certains membres sont des molécules d'adhérence comme la N-CAM.

Inactivation du chromosome X : inactivation au hasard de l'un des chromosomes X qui a lieu dans les cellules somatiques des femelles de mammifères.

Indéterminé : (1) qualifie la croissance chez les plantes qui ne forment pas un nombre défini de feuilles ou de fleurs. (2) chez un animal, désigne une cellule ou un tissu non encore engagé dans une voie de différenciation donnée suite à une induction.

Indice digital 2D : 4D : aussi appelé indice de Manning ou encore ratio digital. Rapport entre la longueur de l'index (doigt 2D) et celle de l'annulaire (doigt 4D) de la main droite. Cet indice est généralement inférieur à 1 chez les hommes et supérieur ou égal à 1 chez les femmes.

Induction : processus par lequel, chez l'embryon, un groupe de cellules émet des signaux vers un autre groupe cellulaire, assignant à celui-ci comment se développer.

Inflorescence : tête florale d'une plante ou la tige portant les fleurs.

Influx nerveux : voir Potentiel d'action.

Information de position : information moléculaire pouvant être fournie sous la forme d'un gradient de concentration d'une molécule de signalisation extracellulaire, et qui peut être interprétée par les cellules pour fournir la base de la mise en place de l'organisation de l'embryon.

Ingénierie tissulaire : construction *in vitro* de tissus de substitution à des fins de réparation de tissus (ou de partie d'organisme) endommagés *in vivo*.

Inhibition latérale : mécanisme par lequel des cellules inhibent leurs voisines et les empêchent de se développer comme elles.

Initiation de la transcription : étape essentielle de l'expression d'un gène. Pour la plupart des gènes du développement, elle est sous un contrôle strict faisant que les gènes ne sont exprimés qu'au bon endroit et au bon moment.

Instructive : se dit d'une induction pour laquelle les cellules répondent différemment en fonction des concentrations du signal inducteur.

Intégrine : membre d'une famille de molécules d'adhérence cellulaire assurant majoritairement des liens cellule/matrice extracellulaire.

Interaction cellule-cellule, signalisation cellule-cellule : termes généraux pour décrire des types variés de communication entre cellules, par lesquels une cellule influence le comportement d'une autre. La communication peut s'établir grâce à des contacts entre cellules avec l'interaction de molécules de signalisation fixées sur la membrane de l'une des cellules en contact et des récepteurs sur l'autre, ou *via* la sécrétion de molécules de signalisation agissant sur des récepteurs spécifiques sur (ou dans) d'autres cellules proches ou à distance.

Intercalation médio-latérale : mouvements cellulaires impliqués dans l'extension convergente lors de la gastrulation chez les amphibiens. Les cellules s'imbriquent entre elles, ce qui provoque au niveau de la couche cellulaire, selon des directions perpendiculaires, une extension dans l'une de celles-ci, et un rétrécissement dans l'autre.

Intercalation radiaire : processus concernant l'ectoderme multicouche d'une gastrula d'amphibien, dans lequel les cellules s'intercalent dans une direction perpendiculaire à la surface, ce qui provoque l'amincissement et l'extension de l'ectoderme.

Interférence à ARN (ARNi) : méthode de suppression de l'expression post-transcriptionnelle d'un gène en promouvant la destruction d'un ARNm donné en le ciblant par une nucléase par l'intermédiaire d'un petit ARN complémentaire appelé ARN interférent (ARNsi).

Interneurone : type de neurone du système nerveux central, qui transmet des signaux d'un neurone à un autre.

Invagination : déformation locale liée à un mouvement d'ensemble d'une population de cellules qui s'internalise sans qu'il y ait disparition du caractère épithélial du tissu, et formant une structure renflée, tel que cela peut s'observer au début de la gastrulation chez l'embryon d'oursin.

Invalidation génique (ou *Knock-out* d'un gène) : chez un organisme, inactivation complète et permanente d'un gène particulier, ou sa délétion, suite à une manipulation génétique.

Involution : type de mouvement cellulaire se produisant au début de la gastrulation chez les amphibiens, lorsqu'une couche cellulaire entre dans l'embryon au niveau du blastopore en s'enroulant sous elle-même.

Ipsilatéral : signifie du même côté du corps.

Jonction adhérente : type de jonction d'adhérence cellule/cellule dans laquelle les molécules d'adhérence liant les deux cellules sont des cadhérines, molécules transmembranaires interagissant du côté intracellulaire avec le cytosquelette d'actine.

Jonction communicante (ou jonction *gap*) : jonction cellule/ cellule assurant une communication directe entre les cytoplasmes des cellules concernées et par laquelle des ions et des petites molécules peuvent passer d'une cellule à l'autre.

Jonction mésencéphale-rhombencéphale : siège d'un centre de signalisation dans le cerveau embryonnaire participant à la mise en place du patron de l'organisation de l'encéphale suivant son axe antéro-postérieur.

Jonction neuromusculaire : synapse spécialisée établie entre un motoneurone et une fibre musculaire par laquelle le neurone stimule l'activité musculaire.

Jonction septée : type de jonction cellulaire présente chez les nonvertébrés. Elle a des fonctions similaires à celles des jonctions serrées des vertébrés.

Jonction serrée : type de jonction d'ancrage qui lie très fortement des cellules épithéliales entre elles, et permet la formation d'un épithélium qui, en le délimitant, isole un compartiment de son environnement.

Kératinocyte : cellule différenciée de l'épiderme cutané, qui produit de la kératine, finit par mourir et desquame à la surface de la peau.

Knockdown d'un gène : voir Extinction génique. Knock-in d'un gène : voir Gène gain de fonction.

Knock-out d'un gène : voir Invalidation d'un gène.

Lame basale : couche de matrice extracellulaire fine et dense séparant un feuillet épithélial des tissus sous-jacents. Par exemple, l'épiderme de la peau est séparé du derme par une lame basale. [Aussi appelée membrane basale, bien que n'étant pas une membrane au sens biologique du terme et que ce terme peut prêter à confusion avec celui désignant le domaine membranaire basal d'une cellule polarisée comme une cellule épithéliale (NdT).]

Lame dentaire : bande épaissie d'épithélium stomodéal au niveau des mâchoires où se développeront les dents.

Ligand : terme général pour désigner une molécule se liant à une autre molécule.

Lignage : (1) l'ascendance d'une cellule donnée, c'est-à-dire les cellules progénitrices et la succession de divisions cellulaires qui conduisent à la cellule considérée. (2) la généalogie d'un organisme ou d'une espèce.

Ligne primitive : structure associée au déroulement de la gastrulation chez les embryons d'oiseaux et de mammifères et dont la localisation indique l'axe antéro-postérieur. Zone d'immigration cellulaire, elle forme une bande allongée s'étendant dans l'épiblaste depuis la zone marginale postérieure. Les cellules épiblastiques après avoir pénétré à l'intérieur de l'embryon forment le mésoderme et l'endoderme.

Lignée érythroide : lignée de cellules sanguines à l'origine des globules rouges (érythrocytes) et des mégacaryocytes.

Lignée lymphoïde : lymphocytes du système immunitaire, qui dérivent de la cellule souche hématopoïétique multipotente *via* un progéniteur lymphoïde.

Lignée myéloïde : cellules sanguines comme les granulocytes, les monocytes/macrophages et les mastocytes, qui dérivent de la cellule souche hématopoïétique multipotente *via* une cellule progénitrice érythroïde/myéloïde.

Localisation cytoplasmique : distribution de certains facteurs protéiques ou déterminants dans le cytoplasme d'une cellule qui, si elle n'est pas homogène, peut entraîner lors d'une division de la cellule, une répartition non équivalente de ces substances entre les deux cellules filles.

Macromères : cellules les plus volumineuses produites lors de divisions inégales chez certains embryons, comme ceux de l'oursin, par exemple.

Masse cellulaire interne : ensemble de cellules formant un amas discret à l'intérieur du blastocyste d'un jeune embryon de mammifère et dérivant des cellules internes de la morula. Il constitue le tissu embryogène et celui de quelques structures membranaires extra-embryonnaires.

Maturation de l'ARN : processus chez les cellules eucaryotes par lequel des ARN nouvellement transcrits sont modifiés de multiples façons rendant ainsi fonctionnel un ARNm ou un ARN structural. Elle inclut l'épissage qui procède à l'élimination des introns du transcrit, laissant en place un message codant continu.

Médecine régénérative : approche médicale dont le but est d'utiliser des cellules souches et leurs dérivés pour réparer ou remplacer des tissus malades ou lésés par des tissus sains.

Méiose : désigne un type particulier de division cellulaire, formé de deux divisions successives, qui se produit lors de la formation des gamètes et au cours duquel le nombre des chromosomes est réduit de moitié, de diploïde à haploïde.

Membrane basale : voir Lame basale.

Membrane de fécondation : membrane formée autour d'un œuf de certaines espèces, après la fécondation, qui fait obstacle à l'entrée d'autres spermatozoïdes.

Membranes extra-embryonnaires : structures qui ne participent pas à la constitution de l'embryon même et qui sont impliquées dans la protection et la nutrition de ce dernier. Chez les mammifères, elles forment les tissus amniotique, chorionique et placentaire.

Membrane vitelline, enveloppe vitelline : structure extracellulaire entourant les ovules de diverses espèces animales. Chez l'oursin, après avoir subi des modifications, elle forme la membrane de fécondation.

Méristème : groupe de cellules indifférenciées en constante division au niveau des extrémités en croissance des plantes. Ces cellules donnent naissance à l'ensemble des structures adultes, tiges, feuilles, fleurs et racines.

Méristème apical : ensemble de cellules en division regroupées à l'extrémité d'une tige ou d'une racine de plante en croissance, et au niveau duquel tous les nouveaux tissus sont produits.

Méristème floral : ensemble de cellules en division regroupées à l'extrémité d'une tige et qui est à l'origine de la formation d'une fleur.

Méristème inflorescentiel : méristème qui se développe à partir de méristèmes végétatifs caulinaires et qui produit des tiges portant des fleurs (inflorescences).

Méristème latéral caulinaire : méristème formé par le méristème apical caulinaire et qui est à l'origine des tiges latérales.

Mésectoderme : tissu qui peut donner à la fois de l'ectoderme et du mésoderme.

Mésencéphale : voir Cerveau moyen.

Mésenchyme : tissu conjonctif lâche, essentiellement d'origine mésodermique, dans lequel les cellules sont capables de migrer. Certains épithéliums d'origine ectodermique, comme les crêtes neurales, subissent une transition épithélio-mésenchymateuse.

Mésenchyme primaire : chez les embryons d'oursin, désigne les premières cellules mésodermiques qui pénètrent dans la blastula lors de la gastrulation, et qui migrent le long de la paroi interne du blastocœle. En sécrétant des protéines matricielles, ces cellules sont à l'origine de spicules formant l'endosquelette larvaire.

Mésoderme : feuillet embryonnaire situé entre l'ectoderme et l'endoderme, à l'origine des systèmes squelettique et musculaire, de tissus conjonctifs, du sang, et des organes internes tels que les reins et le cœur.

Mésoderme des lames latérales : mésoderme qui, chez les embryons de vertébrés, s'étale latéralement et ventralement par rapport aux somites et qui est à l'origine des tissus cardiaques, rénaux, gonadiques et sanguins ainsi que des tissus conjonctifs des membres.

Mésoderme intermédiaire : région mésodermique située entre le mésoderme dorsal à l'origine de la chorde et des somites et le mésoderme des lames latérales. Les reins se développent à partir du mésoderme intermédiaire.

Mésoderme para-axial : mésoderme situé de part et d'autre de la ligne médiane dorsale à partir duquel se formeront les somites.

Mésoderme préchordal : partie la plus antérieure du mésoderme chez l'embryon de vertébrés située en avant de la chorde et qui est à l'origine de divers tissus ventraux céphaliques.

Mésoderme présomitique : mésoderme insegmenté localisé entre le nœud (chez le poulet et la souris) et les somites déjà formés. Il

sera à l'origine de nouveaux somites qui se formeront à partir de son extrémité antérieure.

Mésonéphros : rein embryonnaire chez les mammifères qui contribue à la formation des organes reproducteurs mâles et femelles. Il correspond au rein adulte chez les anamniotes.

Métamérisation : mise en place d'une répétition d'unités d'organisation, les métamères, suivant l'axe antéro-postérieur corporel, existant chez les vertébrés, les annélides et les arthropodes. Les segments des insectes ou les nerfs rachidiens des vertébrés en sont, par exemple, l'expression.

Métamorphose : processus par lequel une larve est transformée en adulte. Il est souvent accompagné de changements morphologiques majeurs et du développement d'organes nouveaux tels que les ailes chez les papillons ou les pattes chez les grenouilles.

Métastase : tumeur issue de l'installation de cellules cancéreuses hors de leur site d'origine après migration.

Méthylation de l'ADN : ajout de groupements méthyle sur l'ADN par une enzyme, l'ADN méthylase. Les groupements méthyle liés de façon covalente à l'ADN, affectent l'aptitude de ce dernier à être transcrit.

MicroARN (miARN) : petit ARN qui supprime l'expression de gènes spécifiques.

Microfilament : voir Filament d'actine.

Micromères : cellules les plus petites produites lors de divisions inégales durant le développement précoce de certains embryons, par exemple ceux de l'oursin.

Microtubules : l'un des trois types principaux de filaments protéiques du cytosquelette. Les microtubules (diamètre 25 nm) sont notamment impliqués dans le transport de protéines et d'ARN dans le cytoplasme des cellules.

Migration tangentielle : migration des neurones parallèlement à la surface du cortex.

Mitose : division cellulaire se produisant lors de la prolifération des cellules et conduisant à la formation de deux cellules filles ayant le même nombre de chromosomes que la cellule mère.

Migration cellulaire : mouvement actif de cellules d'une position à une autre dans l'embryon par interactions répétées avec la matrice extracellulaire, souvent orienté par des molécules déposées auparavant dans cette matrice.

Modèle de l'horloge cyclique et du front de détermination : modèle proposé pour rendre compte de la formation périodique des somites. La formation de chaque somite est spécifiée par une « horloge » se manifestant par une expression cyclique régulière de gènes dans le mésoderme présomitique qui interagit avec un front de détermination somitique se déplaçant dans le sens antéro-postérieur.

Modification post-traductionnelle : toute modification qui affecte une protéine après qu'elle a été synthétisée. La protéine peut, par exemple, être clivée, glycosylée ou acétylée par des enzymes.

Module cis-régulateur : voir Régions cis-régulatrices.

Molécule d'adhérence (cellulaire) : désigne un ensemble de familles de protéines qui lient les cellules entre elles ou à la matrice extracellulaire. Les principales classes de molécules d'adhérence importantes pour le développement sont les cadhérines, la superfamille des immunoglobulines et les intégrines.

Morphallaxie : mode de régénération qui implique un remodelage des tissus existants sans phénomène de croissance.

Morphogène : toute substance dont la concentration spatiale varie et pour laquelle les cellules répondent différemment en fonction de divers seuils de concentration.

Morphogenèse : ensemble des processus responsables des modifications de la forme et des structures de l'embryon au cours du développement.

Morphogenèse ramifiée : correspond au type de développement et de croissance de structures tels que les vaisseaux sanguins ou les bronches et bronchioles pulmonaires, qui se manifeste sous la forme de branchements successifs d'un tube épithélial.

Mort cellulaire programmée : voir Apoptose.

Morula : embryon de certains vertébrés (mammifères, amphibiens) en forme de sphère pleine résultant des toutes premières divisions du clivage.

Mosaïque : terme historique utilisé pour décrire le développement d'organismes qui apparaît largement inféodé à une distribution de déterminants cytoplasmiques.

Motoneurone : neurone innervant un muscle, contrôlant sa contraction et donc le mouvement.

Motilité cellulaire : capacité qu'ont les cellules à pouvoir se mouvoir, se contracter ou changer de forme par suite de modifications touchant le cytosquelette.

Mue : phénomène chez les arthropodes, qui consiste en l'élimination de l'ancienne cuticule externe et son remplacement par une nouvelle plus grande, ce qui permet la croissance de l'animal.

Multipotent : désigne l'état d'une cellule pouvant donner plusieurs types de cellules différenciées, appartenant au même organe ou au même tissu.

Mutation à effet maternel : mutation chez la mère sans effets sur le phénotype de la mère elle-même mais qui affecte le développement de l'œuf puis de l'embryon. Les gènes concernés par ces mutations sont appelés gènes à effet maternel.

Mutation conditionnelle : mutation dont les effets se manifestent dans une condition particulière, par exemple à une température plus élevée que la normale.

Mutation létale embryonnaire : toute mutation provoquant la mort d'un embryon.

Mutation thermosensible : mutation qui engendre un changement phénotypique seulement à une certaine température différente de la normale, le plus souvent supérieure.

Myoblaste : cellule engagée dans la voie de différenciation myogénique, mais pas encore morphologiquement différenciée.

Myocarde : couche contractile du cœur composé de cellules musculaires appelées cardiomyocytes.

Myoplasme : domaine cytoplasmique particulier dans les œufs d'ascidies impliqué dans la spécification des cellules musculaires.

Myotome : région somitique à l'origine de muscles.

Myotube : cellule multinucléée constituant un stade intermédiaire de la différenciation myogénique. Un myotube résulte de la fusion de myoblastes et se différencie en fibre musculaire.

Neuréguline : membre d'une famille de protéines chimioattractives impliquées dans le guidage de la migration tangentielle des neurones au cours du développement du cerveau.

Neuroblaste : cellule embryonnaire à l'origine de cellules du tissu nerveux (neurones et glie).

Neuroectoderme : région ectodermique embryonnaire ayant la potentialité de former des cellules nerveuses.

Neurogenèse : formation des neurones à partir de leurs précurseurs.

Neurogénine : facteur de transcription produit spécifiquement dans les futurs neurones.

Neuroligine : protéine présente sur la membrane post-synaptique de certaines synapses et interagissant avec la protéine transmembranaire β -neurexine située sur la membrane pré-synaptique pour promouvoir la différenciation fonctionnelle de la synapse.

Neurone : type cellulaire du système nerveux, appelé aussi cellule nerveuse, électriquement excitable, qui transmet une information sous forme de signaux électriques à d'autres neurones, des cellules musculaires et quelques cellules glandulaires. Les neurones communiquent entre eux *via* des structures spécialisées nommées synapses (*voir ce terme*).

Neurone commissural : neurone dans la moelle épinière des vertébrés ou dans la chaîne nerveuse ventrale des insectes dont l'axone franchit la ligne médiane et contribue à la formation de commissures connectant les neurones du côté controlatéral.

Neurone post-mitotique : neurone formé à partir d'une cellule précurseur, et appelé ainsi car beaucoup de neurones ne se divisent plus une fois formés.

Neurone sensoriel : type de neurone dont l'activité est déclenchée par des signaux provenant de l'intérieur du corps (allongement du muscle, par exemple) ou de l'environnement (contact physique, chaleur) et transmettant cette information au système nerveux central.

Neurotrophine : voir Facteur neurotrophique.

Neurula : stade embryonnaire du développement des vertébrés succédant à l'étape de la gastrulation, au cours duquel se forme le tube neural.

Neurulation : étape du développement des vertébrés au cours de laquelle se forme le futur système nerveux (encéphale et moelle épinière) à partir de la plaque neurale ectodermique. Suite à d'importantes modifications morphologiques cellulaires, elle débute par l'épaississement de l'ectoderme formant la plaque neurale, et celle-ci se creuse en une gouttière neurale bordée par deux replis qui, en se rejoignant, fusionnent dorsalement sur la ligne médiane et forment un tube neural. Chez les oiseaux et les mammifères, la plaque neurale donne naissance au cerveau et la partie terminale de la moelle épinière est formée à partir de la zone souche.

Neurulation primaire : repliement de la plaque neurale en un tube neural.

Neurulation secondaire : chez les vertébrés, formation du tube neural postérieur, après la zone lombo-sacrée, sous forme d'une baguette cellulaire pleine issue de cellules de type cellules souches situées dans le bourgeon de la queue. Dans cette baguette, une cavité interne ou lumière se met en place secondairement, qui sera finalement connectée avec celle du tube neural antérieur.

Néoblastes : population de petites cellules indifférenciées chez les planaires, qui sont les seules cellules à se diviser par mitose, chez les individus adultes. Non seulement elles s'auto-renouvellent mais aussi peuvent s'autodifférencier dans tous les types cellulaires : cellules épidermiques et musculaires, neurones, et cellules germinales.

Nécrose : type de mort cellulaire due à une lésion pathologique qui en détruisant les cellules, entraîne la libération de leurs contenus.

Néoténie : phénomène par lequel un animal acquiert la maturité sexuelle alors qu'il est encore à l'état larvaire.

Nétrine : protéine sécrétée agissant comme une molécule de guidage pour les neurones, les nétrines pouvant être soit chimioattractives soit chimiorépulsives.

Niche de cellules souches : cellules voisines des cellules souches dans les tissus, qui forment et maintiennent un environnement spécialisé favorisant la survie et l'auto-renouvellement de ces cellules.

Nodal, protéines apparentées à Nodal : protéines de signalisation des vertébrés constituant une sous-famille de la famille du TGF-β. Elles sont impliquées dans toutes les étapes du développement, et plus particulièrement dans l'induction et la mise en place du patron du mésoderme.

Nœud : (1) chez les embryons d'oiseaux et de mammifères, centre organisateur embryonnaire homologue de l'organisateur de Spemann des amphibiens. Il est désigné sous le terme de nœud de Hensen chez les oiseaux. (2) chez les plantes, la partie de la tige où se forment les feuilles et les bourgeons latéraux.

Nœud de Hensen : condensation cellulaire à l'extrémité antérieure de la ligne primitive des embryons de poulet qui correspond à l'organisateur de Spemann chez les amphibiens. La région équivalente chez les mammifères est simplement appelée nœud. Les cellules du nœud sont à l'origine de la plaque préchordale et de la chorde chez les embryons de poulet, et de la chorde chez les mammifères.

Non autonome : se dit de l'expression génique d'une cellule qui affecte des cellules autres que celle dans laquelle le gène est exprimé. Par exemple, les gènes codant des protéines de signalisation sécrétées ont des effets non-autonomes.

Nucléases à doigt de zinc (ou ZFN pour *Zinc-Finger Nucleases*) : nucléases qui sont utilisées pour introduire *in vivo* de manière ciblée des mutations dans des gènes et ainsi les inactiver fonctionnellement.

Nucléosome : unité structurale typique de la chromatine, consistant en un cœur de protéines histones autour duquel s'enroule l'ADN.

Nymphe : chez les insectes subissant une métamorphose, stade qui suit les stades larvaires, qui peut être dormant pendant de longues périodes et durant lequel la métamorphose survient. Stade aussi appelé chrysalide chez les papillons et pupe chez les diptères comme la drosophile.

Œuf-cylindre : structure cylindrique comprenant l'épiblaste recouvert par l'endoderme viscéral au stade post-implantation précoce de l'embryogenèse de souris.

Ommatidie : unité anatomo-fonctionnelle de l'œil composé des insectes, formée d'une lentille, d'un petit nombre de photorécepteurs et de cellules de soutien. Il y a plusieurs centaines d'ommatidies dans un œil composé.

Ontogenèse : développement d'un individu.

Oral : désigne la bouche ou la région corporelle se référant à l'emplacement du corps où se trouve la bouche.

Oreillette : voir **Chambre auriculaire**.

Organisateur, région organisatrice, centre organisateur : centre inducteur qui dirige le développement de l'embryon dans son ensemble ou d'une partie seulement, tel qu'un membre. Chez les amphibiens, l'organisateur fait généralement référence à l'organisateur de Spemann. Le centre organisateur chez les plantes fait référence aux cellules bordant la zone centrale du méristème qui contient les cellules souches.

Organisateur blastuléen : voir Centre de Nieuwkoop.

Organisateur embryonnaire : autre appellation du centre organisateur de Spemann chez les amphibiens et de régions organisatrices chez

les autres vertébrés tels que le nœud de Hensen chez le poulet, qui peuvent régir le développement d'un embryon complet.

Organisateur local : terme général désignant tout centre de signalisation ayant des effets localisés sur les tissus voisins, comparé à l'organisateur embryonnaire, avec pour exemple les centres organisateurs à la jonction des cerveaux moyen et postérieur (mésencéphale-rhombencéphale), la crête neurale antérieure, et la *zona limitans intrathalamica* dans l'encéphale des vertébrés en développement.

Organisateur de Spemann, organisateur de Spemann-

Mangold : centre de signalisation sur la face dorsale du jeune embryon d'amphibien qui intervient comme l'organisateur embryonnaire principal. Ses signaux sont responsables de l'organisation des axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

Organismes modèles : désignent un petit nombre d'espèces couramment étudiées en biologie du développement et dont le développement est le mieux connu.

Organogenèse : développement d'organes spécifiques comme les membres, les yeux ou le cœur.

Ossification endochondrale : remplacement des structures squelettiques cartilagineuses embryonnaires par du tissu osseux dans les zones de croissance comme cela se produit pour les os longs des membres des vertébrés.

Ostéoblastes : cellules précurseurs à partir desquelles se forment les cellules osseuses différenciées, les ostéocytes.

Ovaire : chez les animaux, gonade femelle où se déroule l'ovogenèse.

Ovariole : unité anatomo-fonctionnelle d'un ovaire d'insecte, dont la drosophile, de forme tubulaire, où se déroule l'ovogenèse et où sont disposés en file des follicules en cours d'évolution.

Oviductes : conduits chez la femelle des oiseaux et des mammifères par lesquels s'effectue le transit des ovules des ovaires à l'utérus.

Ovocyte : cellule germinale femelle ayant cessé de se diviser par mitoses.

Ovocyte primaire : cellule germinale femelle qui entre en méiose.

Ovogenèse : ensemble des processus conduisant à la formation d'un ovule chez les femelles.

Ovogonies : cellules germinales diploïdes se divisant par mitose dans l'ovaire avant de devenir des ovocytes entrant en méiose.

Ovule : (1) cellule germinale pondue par l'ovaire et qui subit une fécondation. (2) structure pluricellulaire des plantes qui contient l'oosphère.

Palette de la main : région à l'extrémité distale du membre antérieur en formation chez les vertébrés et à partir de laquelle se formeront les doigts.

Pallium : partie superficielle du prosencéphale embryonnaire qui se développe en cortex cérébral, couche externe des hémisphères cérébraux où siègent les centres de traitement les plus élaborés pour l'information sensorielle, le contrôle moteur, l'apprentissage et la mémoire.

Papille dentaire : condensation des cellules ectomésenchymateuses à l'origine de la dentine et de la pulpe dentaire, tissu conjonctif lâche au centre de la dent.

Parasegments : unités anatomiques se développant le long du corps de l'embryon de drosophile qui donneront naissance, avec un léger chevauchement, aux segments de la larve et de l'adulte.

Parthénogenèse : mode de reproduction sexuée se caractérisant par le développement d'œufs en l'absence de fécondation.

Périclinal : qualifie des divisions organisées selon des plans parallèles à la surface du tissu.

Permissive : se dit de l'induction pour laquelle une cellule n'a qu'un seul type de réponse suite à un signal inducteur, et que cette réponse n'est produite que lorsqu'un niveau donné de ce signal est atteint.

Période critique : période pendant laquelle un tératogène peut interférer avec le développement d'un organe particulier.

Petit ARN interférent (ARNsi) : la technique de l'interférence à ARN consiste à utiliser un court ARN simple brin qui possède une séquence complémentaire exacte d'un ARNm d'un gène donné et qui, associé à une nucléase, permet de cibler cet ARNm pour le détruire.

Phénotype : traits et caractères observables ou quantifiables d'une cellule ou d'un organisme.

Phocomélie : malformation congénitale dans laquelle les parties proximales du membre sont absentes, alors que les parties distales, comme les doigts, sont présentes et peuvent être quasiment normales.

Photopériodisme : réponse d'un organisme à la durée relative du jour. Chez les plantes, il est responsable du déclenchement de la floraison quand la durée du jour s'allonge.

Phyllotaxie : arrangement de l'insertion des feuilles le long d'une tige.

Phylogénie : histoire évolutive d'une espèce ou d'un groupe d'espèces.

Placenta : structure jouant un rôle d'interface au niveau de la paroi utérine, entre les systèmes sanguins maternel et fœtal. À l'exception des monotrèmes, (ornithorynque et échidné) et des marsupiaux, les embryons de mammifères sont alimentés par leur mère grâce au passage placentaire de nutriments.

Placode : région épaissie d'un épithélium, généralement à la surface corporelle d'un l'embryon, qui donne naissance à une structure particulière. Un exemple est la placode cristallinienne qui donnera le cristallin de l'œil.

Placode dentaire : voir Bourgeon dentaire.

Plan corporel : désigne l'organisation générale d'un organisme, avec pour exemple les positions relatives de la tête et de la queue, ainsi que le plan de symétrie bilatérale quand ce dernier existe. Le plan corporel de la plupart des espèces animales s'organise autour de deux axes principaux, les axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

Plaque du plancher : petite région située au niveau de la ligne médiane ventrale du tube neural en développement et composée de cellules non nerveuses. Elle est impliquée dans la mise en place de l'organisation de la partie ventrale du tube neural.

Plaque du toit : fine bande de cellules non neuronales au niveau de la ligne médiane de la partie dorsale du tube neural, impliquée dans la mise en place du patron d'organisation du tube neural dorsal.

Plaque neurale : zone ectodermique dorsale épaissie dans la région antérieure des embryons de vertébrés à l'origine du système nerveux *via* le phénomène de neurulation.

Plasme germinal : fraction cytoplasmique particulière dans les œufs de certaines espèces animales, tels ceux de la drosophile, impliquée dans la spécification des cellules germinales.

Plasme polaire : cytoplasme de la zone postérieure de l'œuf de drosophile qui est impliqué dans la spécification des cellules germinales.

Plasmodesme : cordon de cytoplasme traversant les parois de deux cellules végétales adjacentes et mettant en communication leur cytoplasme.

Pluripotent : état désignant une cellule souche qui peut être à l'origine de tous les types cellulaires de l'organisme.

Plutéus : stade larvaire de l'oursin.

Points de contrôle du cycle cellulaire : moments du cycle cellulaire pendant lesquels la cellule vérifie que toutes les étapes précédentes ont été correctement et complètement réalisées avant que ne débute l'étape suivante.

Points de flexion dorso-latérale : sites sur chaque côté du tube neural en formation au niveau desquels le tube se plie, ce qui rapproche les sommets des replis neuraux, et permet au final leur fusion et la fermeture du tube neural.

Point de flexion médian : axe médian de la plaque neurale, au niveau duquel la plaque se plie lors de la formation du tube neural.

Polarité : propriété que possèdent une cellule, une structure tissulaire ou un organisme chez lesquels une région a des caractéristiques différentes d'une autre.

Polarité apico-basale : polarité cellulaire observable dans un épithélium, dans lequel les faces apicale et basale des cellules ont des propriétés différentes.

Polarité planaire : polarisation des cellules dans le plan du tissu.

Pôle abembryonnaire : voir Axe embryonnaire-abembryonnaire.

Pôle animal : voir Région animale.

Pôle artériel : extrémité antérieure du tube cardiaque, qui deviendra le tronc artériel efférent.

Pôle végétatif : zone superficielle centrale de la région végétative, directement opposée au pôle animal. *Voir Région végétative*.

Pôle veineux : extrémité postérieure du tube cardiaque qui formera la partie afférente veineuse.

Polydactylie : présence de doigts ou d'orteils surnuméraires aux mains ou aux pieds.

Polydactylie préaxiale : présence de doigts surnuméraires dans la partie antérieure des mains ou des pieds, du côté pouce ou gros orteil.

Polyspermie : entrée de plus d'un spermatozoïde dans un ovule.

Postérieur : indique la position ou la direction de l'extrémité caudale d'un embryon ou d'un animal.

Post-synaptique : désigne le côté d'une synapse qui reçoit le signal.

Potentiel d'action (ou **influx nerveux**) : signal électrique généré dans un neurone quand il reçoit un influx excitateur suffisant. Il se propage le long de l'axone et déclenche la libération d'un neurotransmetteur à partir de la terminaison axonale.

Précurseur d'un organe sensoriel (SOP pour *Sensory Organ Precursor*) : cellule ectodermique à l'origine d'un organe sensoriel de l'épiderme d'une drosophile adulte, comme les soies sensorielles.

Pré-patron : (1) organisation de base générée automatiquement dans une structure et qui peut être modifiée au cours du développement.(2) organisation d'une structure avant qu'elle ne soit complètement différenciée.

Pré-synaptique : désigne le côté d'une synapse qui émet le signal.

Primordium (pl. primordia) : petite ébauche indifférenciée qui formera une structure telle qu'une dent, une feuille, une fleur ou un organe floral.

Primordium d'organe floral : partie d'un méristème floral qui a acquis une spécification pour donner naissance à des parties spécifiques d'une fleur comme les pétales ou les étamines, par exemple. **Primordium de la ligne latérale :** chez les poissons, groupe de cellules issues de l'ectoderme du crâne, qui migrent collectivement le long de la future ligne latérale en déposant au cours de cette migration des amas de cellules précurseurs des organes sensoriels formant les organes de la ligne latérale.

Primordium foliaire : petit groupe de cellules situé en périphérie du méristème apical caulinaire et à partir duquel une feuille se développe.

Processus céphalique : partie antérieure de la chorde qui s'étend dans la région céphalique des embryons d'oiseaux et de mammifères.

Proembryon : stade deux cellules du développement embryonnaire d'une plante.

Programme générateur : instructions nécessaires au développement contenues dans le génome, déterminant le moment et le lieu de la production des protéines qui contrôlent le comportement cellulaire et par là, le développement.

Progression tumorale : série d'étapes successives transformant des cellules normales en cellules cancéreuses et conduisant à la formation d'une tumeur.

Prolifération cellulaire : croissance et division cellulaire produisant de nouvelles cellules, moyens par lesquels une structure ou un embryon peut s'accroître en taille.

Proméristème : région centrale d'un méristème contenant les cellules capables de divisions permanentes, les cellules initiales.

Promoteur : région de l'ADN située juste avant la séquence codante et à laquelle l'ARN polymérase se lie lors du début de la transcription du gène.

Pronéphros : rein primaire des embryons de vertébrés qui se différencie à partir du mésoderme intermédiaire. Fonctionnel chez les embryons et larves de poissons et d'amphibiens, il dégénère chez les vertébrés amniotes chez lesquels se développe un rein adulte à partir du métanéphros.

Pronucléus : nom donné au noyau haploïde de spermatozoïde ou d'ovule après la fécondation mais avant la fusion nucléaire et la première division mitotique.

Prosencéphale : voir Cerveau antérieur.

Protéines Aux/IAA : famille de protéines qui, en se liant à des facteurs de réponse à l'auxine, bloque l'expression des gènes de réponse à l'auxine en l'absence de cette hormone végétale.

Protéines kinases cycline-dépendantes (Cdks pour *Cyclin-dependent kinases*) : kinases jouant des rôles spécifiques pendant des phases particulières du cycle cellulaire et qui sont activées par la fixation de cyclines. L'activité des Cdks varie au cours du cycle cellulaire de la même manière que varient les concentrations des cyclines.

Protéines PAR : protéines découvertes initialement chez *Caenorhabditis elegans* qui sont nécessaires pour le positionnement correct et l'orientation des fuseaux de division lors des premières divisions de segmentation et qui permettent à ces derniers d'être à la bonne place dans la cellule et dans le plan adéquat.

Protéine régulatrice génique : terme général désignant n'importe quelle protéine impliquée dans l'activation ou la répression d'un gène.

Protéines Slit : famille de protéines sécrétées donnant des informations de guidage en repoussant les axones dans le système nerveux en développement.

Protéines Wnt : famille de protéines de signalisation sécrétées et présentes chez tous les métazoaires, y compris les éponges, dont les différents membres agissent dans divers contextes du développement. Cette famille inclut les protéines Wingless chez la drosophile et Wnt chez les vertébrés. Les protéines Wnt agissent *via* des voies de signalisation variées comme la voie canonique Wnt/β-caténine et la voie de polarité planaire Wnt.

Proto-oncogène : gène impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire et pouvant provoquer un cancer s'il est muté ou exprimé de manière anormale.

Protostomiens : une des deux lignées évolutives d'animaux bilatériens, incluant notamment les insectes et les nématodes, se caractérisant par l'absence de clivage radiaire et par la formation de la bouche à partir du blastopore.

Pupe : voir Nymphe.

Recombinaison : échange de portions d'ADN entre chromosomes homologues durant la méiose, qui entraîne de nouvelles combinaisons des gènes parentaux dans les gamètes haploïdes.

Recombinaison homologue : recombinaison de deux molécules d'ADN au niveau d'un site particulier comportant une similitude séquentielle.

Redondance : existence de différents gènes ou voies biologiques qui peuvent se substituer les uns aux autres au cours du développement.

Repli céphalique : repliement des trois feuillets embryonnaires au niveau de la région céphalique des embryons de poulet et de mammifères qui manifeste le début du développement du pharynx et du tube digestif antérieur.

Replis neuraux (ou **bourrelets neuraux**) : désignent les deux replis apparaissant en bordure de la plaque neurale au début de la neurulation, qui finiront par fusionner pour former le tube neural à l'origine du système nerveux.

Restriction clonale (ou **de lignage cellulaire**) : situation où toutes les cellules-filles d'un groupe initial de cellules restent ensemble et ne se mélangent pas avec d'autres cellules de lignées différentes. Ce groupe cellulaire particulier forme un compartiment.

Réaction acrosomique : libération d'enzymes et diverses autres protéines contenues dans l'acrosome de la tête du spermatozoïde qui se produit une fois que ce dernier s'est fixé à la membrane vitelline ou la zone pellucide entourant l'ovule. Elle permet au spermatozoïde de pénétrer dans cette dernière et de s'approcher de la membrane plasmique ovulaire.

Récessive : se dit d'une mutation qui change le phénotype seulement quand les deux copies d'un même gène portent la mutation.

Régénération : remplacement de parties corporelles perdues accidentellement chez un organisme ayant fini son développement.

Région animale : région correspondant dans les œufs d'amphibiens à l'hémisphère situé à l'opposé de la masse vitelline et dans lequel est localisé le noyau. L'extrémité de cette région constitue le pôle animal, qui est directement opposé au pôle végétatif situé à l'autre extrémité. Chez le xénope, la coiffe animale désigne la partie pigmentée de la région animale.

Régions cis-régulatrices : séquences non codantes flanquant un gène qui possèdent des sites pour la fixation de facteurs de transcription (activateurs ou répresseurs) permettant de contrôler l'expression de ce gène. De nombreuses régions régulatrices de gènes du développement présentent une succession de différents modules *cis*-régulateurs qui sont des petites régions contenant des sites de liaison multiples pour différents facteurs de transcription ; la combinaison des facteurs liés détermine si le gène est activé ou non. Divers modules régulateurs contrôlent l'expression des gènes à différents lieux et moments au cours du développement.

Région codante : partie d'un gène qui code un polypeptide ou un ARN fonctionnel.

Région de contrôle : région d'un gène constituée par l'ensemble de ses régions régulatrices (*voir Régions cis-régulatrices*).

Région de contrôle du locus : région *cis*-régulatrice contrôlant l'expression séquentielle des gènes d'un locus multigénique, comme les complexes des gènes globine ou Hox. En général, cette région est située assez loin des gènes qu'elle contrôle.

Région déterminante du sexe sur le chromosome Y (ou **SRY** pour *Sex-determining Region of the Y chromosome*) : locus sur le chromosome Y responsable de la masculinité en spécifiant les gonades en testicules.

Régions interdigitales : régions se trouvant entre les doigts d'une main ou d'un pied en développement.

Région végétative : hémisphère inférieur vitellin des œufs et blastulas des amphibiens, formant la région à partir de laquelle se développera l'endoderme.

Régulation : capacité qu'a un embryon de se développer normalement même après élimination ou réarrangement de certaines de ses parties. Les embryons qui peuvent réaliser une régulation ont un développement dit à régulation.

Répresseur : protéine de régulation génique qui participe à l'extinction de l'activité d'un gène lorsqu'elle se lie à un site particulier de la région de contrôle du gène.

Réseau de régulation génique : désigne les interactions géniques, notamment ceux impliquant des gènes des facteurs de transcription exprimés durant un processus particulier dans le développement. De tels réseaux peuvent être représentés de manière schématique.

Rétrocontrôle : voir Boucle de rétroaction.

Rhombencéphale : voir Cerveau postérieur.

Rhombomère : désigne une des 8 subdivisions correspondant à des compartiments à restriction de lignage cellulaire et qui résultent de la segmentation du rhombencéphale des embryons de poulet et des mammifères.

Robo : famille de récepteurs portés par les neurones, liant la protéine chimiorépulsive Slit.

Rotation corticale : mouvement affectant le cortex d'un œuf d'amphibien qui se produit immédiatement après la fécondation. Le cortex effectue sa rotation en direction du point d'entrée du spermatozoïde sans affecter le cytoplasme sous-jacent.

Sclérotome : région somitique qui donne naissance au cartilage des vertèbres.

Segmentation : subdivision d'un organisme, ou d'une structure particulière, en une succession d'unités morphologiques (les segments) le long de l'axe antéro-postérieur. [Terme en anglais souvent assimilé à celui de métamérisation en français. Il est aussi couramment utilisé comme synonyme de clivage (NdT).]

Semi-dominante : se dit d'une mutation qui affecte le phénotype quand juste un allèle porte la mutation, mais où l'effet sur le phénotype est plus marqué quand les deux allèles portent la mutation. **Seuil de concentration :** niveau de concentration d'un signal chimique pouvant déclencher une réponse cellulaire particulière.

Sémaphorine : famille de protéines sécrétées agissant comme signaux de guidage pour les neurones.

Sénescence : détérioration fonctionnelle à tous les niveaux de l'organisme, dont cellulaire, associée à l'âge.

Séquençage d'ARN (pour *RNA seq*) : méthode utilisée pour déterminer quels gènes sont exprimés dans un tissu particulier ou à un moment donné au cours du développement, par laquelle la totalité des ARN des cellules est convertie par transcription inverse en ADNc, qui est ensuite soumis à un séquençage.

Signalisation intracellulaire : processus par lequel un signal extracellulaire reçu par un récepteur à la surface d'une cellule, est relayé en aval vers sa destination finale à l'intérieur de la cellule, par une série de protéines de signalisation intracellulaires interagissant les unes avec les autres.

Sillon morphogénétique : lors de la formation de l'œil de la drosophile, sillon se déplaçant à travers le disque imaginal oculaire et qui initie le développement des ommatidies.

Sillon neural : repliement longitudinal de l'épithélium de la plaque neurale le long de l'axe médian, dû à des modifications localisées de la forme cellulaire. C'est l'un des premiers signes de la neurulation.

Situs inversus : état rare en anatomie humaine dans lequel les organes internes sont totalement disposés en miroir.

Somatolibérine (ou **GH-RH** pour *Growth Hormone–Releasing Hormone*) : hormone polypeptidique produite par l'hypothalamus stimulant la production d'hormone de croissance par l'antéhypophyse.

Somatostatine : hormone protéique produite par l'hypothalamus qui inhibe la synthèse et la libération de l'hormone de croissance par l'hypophyse.

Somites : blocs de mésoderme qui proviennent d'une segmentation du mésoderme pré-somitique situé de part et d'autre de la chorde. Ils sont à l'origine des muscles du tronc et des membres, des vertèbres et des côtes ainsi que du derme.

Spermatozoïde : gamète mâle haploïde.

Spermatogenèse : ensemble des processus conduisant à la formation des spermatozoïdes.

Spécifié : se dit de l'état de développement de cellules ou de groupes de cellules qui, isolés et cultivés dans un milieu neutre, se développeront selon leur destinée normale.

Stade cordiforme : stade de l'embryogenèse des plantes dicotylédones où les cotylédons et la racine embryonnaire commencent à se former, conférant à l'embryon la forme d'un cœur.

Stade de l'écusson : désigne un stade embryonnaire chez le poissonzèbre où l'organisateur, l'écusson, est formé sur un côté du blastoderme.

Stade sphère : stade du développement du poisson-zèbre correspondant à un embryon qui est sous la forme d'un blastoderme hémisphérique d'environ 1 000 cellules reposant sur une masse sphérique de vitellus.

Stade globulaire : stade du développement embryonnaire d'une plante au cours duquel l'embryon a l'allure d'une sphère d'environ 32 cellules.

Stade larvaire : état juvénile présenté par certaines espèces, et qui se caractérise par l'existence d'un phénomène de croissance entre chaque mue jusqu'à l'atteinte de l'état adulte.

Stade octant : stade huit cellules du développement embryonnaire d'une plante.

Stade phylotypique : stade où les embryons des différents groupes de vertébrés se ressemblent fortement. À ce stade les embryons présentent de manière distincte une tête, un tube neural et des somites.

Structures axiales : chez les vertébrés, désignent les structures formées et situées le long de l'axe principal corporel tels que la chorde, la colonne vertébrale et le tube neural, les somites étant des structures para-axiales.

Structures de Turing : voir Système de réaction-diffusion.

Substance blanche : régions du système nerveux central (cerveau et moelle épinière) qui sont essentiellement constituées par les axones des neurones, par opposition à la substance grise.

Substance grise : régions du système nerveux central (cerveau et moelle épinière) essentiellement composées des corps cellulaires des neurones.

Suspenseur : structure qui attache l'embryon de plante aux tissus maternels et qui permet son approvisionnement en substances nutritives.

Symétrie bilatérale : type de symétrie que présentent des animaux avec un plan principal de symétrie céphalo-caudal et de part et d'autre de celui-ci, des parties corporelles développées en miroir.

Symétrie radiaire : symétrie de part et d'autre d'un axe central de structures cylindriques telle qu'une tige ou une racine, ou sphérique comme par exemple certaines blastulas animales.

Synapse : jonction cellule-cellule spécialisée dans laquelle la terminaison de l'axone d'un neurone transmet un signal à un autre neurone ou à une cellule musculaire par l'intermédiaire d'un neurotransmetteur chimique qui diffuse à travers un espace réduit (la fente synaptique) entre les deux membranes apposées, et qui se lie à des récepteurs sur la cellule receveuse. La cellule qui transmet est dite neurone pré-synaptique et celle qui est réceptrice est dite post-synaptique.

Syncytium : cellule contenant plusieurs noyaux dans un cytoplasme unique.

Syndrome : ensemble de symptômes affectant souvent diverses fonctions corporelles, qui caractérise un état pathologique particulier.

Système de réaction-diffusion : mécanisme pouvant produire des profils de concentrations d'éléments chimiques qui s'auto-organisent et être à l'origine de structures dites de Turing. Ce modèle a été proposé pour rendre compte de certains processus du développement notamment morphogénétiques.

Système Cre/*loxP* : système permettant une mutagenèse conditionnelle chez la souris qui rend possible, dans des lignées de souris transgéniques, l'expression d'un gène dans un tissu spécifique ou à un moment particulier du développement.

Système CRISPR/Cas9 : système d'édition du génome dérivé d'une bactérie qui peut être introduit dans une cellule animale afin de réaliser des mutations ciblées précises.

Système nerveux central : l'encéphale et la moelle épinière.

Système nerveux périphérique : tous les constituants du système nerveux à l'exception du cerveau et de la moelle épinière.

Système trachéen : chez les insectes, système de fins tubules qui délivre l'air, et donc l'oxygène, aux tissus.

TALENS (pour Transcription Activator-Like Effector

Nucleases) : nucléases qui peuvent être utilisées pour effectuer des mutations ciblées dans l'ADN.

Tectum : voir **Toit optique**.

Terminaison axonale : voir Axone.

Testicules : chez les animaux, organe reproducteur mâle où se déroule la spermatogenèse.

Télencéphale : partie de l'encéphale embryonnaire résultant de la subdivision du cerveau antérieur, le prosencéphale, et à l'origine du pallium et des ganglions de la base.

Télomère : structure constituée de répétitions d'ADN non codant à chaque extrémité d'un chromosome qui évite une adhérence entre chromosomes et prévient une perte de gènes lors de la duplication de l'ADN. Les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire.

Tératocarcinome : tumeur maligne solide issue de cellules germinales, qui contient typiquement un mélange de types cellulaires différenciés ne provenant pas d'un même feuillet embryonnaire et de cellules indifférenciées fonctionnant comme cellules souches embryonnaires. Injectées sous la peau d'une souris adulte, des cellules ES non différenciées provoquent l'apparition de tératocarcinomes.

Tératogène : désigne tout agent environnemental (agents chimiques, physiques ou infectieux) qui provoque un développement embryonnaire anormal.

Tératome : tumeur solide encapsulée contenant un mélange de tissus, avec souvent des cellules différenciées issues de différents feuillets embryonnaires. Elle peut se développer à partir de cellules germinales ou de cellules embryonnaires pluripotentes. Des cellules souches embryonnaires indifférenciées humaines injectées sous la peau de souris immunodéprimées forment des tératomes, et cette propriété a été utilisée pour évaluer une pluripotentialité.

Tétraploïde : se dit d'une cellule qui contient chacun de ses chromosomes en quatre exemplaires, ou d'une espèce dont les cellules somatiques contiennent 4n chromosomes.

Tête: structure localisée à l'extrémité antérieure des animaux à symétrie bilatérale comme les arthropodes ou les vertébrés, qui abrite le cerveau (ou son équivalent), différents organes sensoriels et la bouche.

Thalamus : région de l'encéphale dérivant du diencéphale, qui constitue chez les mammifères un relais précortical majeur pour toutes les informations, notamment sensorielles destinées au cortex cérébral.

Thérapie cellulaire : guérison d'une maladie impliquant le remplacement des cellules endommagées par des cellules saines, en particulier des cellules souches. Jusqu'ici, seules les thérapies cellulaires concernant les cellules hématopoïétiques exploitent couramment un transfert de cellules souches (par transfert de moelle osseuse, une source naturelle de cellules souches), mais les recherches sont actives pour exploiter d'autres types de cellules souches.

TILLING (pour Targeting-Induced Local Lesions in

Genomes) : technique pour détecter des mutations en hybridant l'ADN muté avec un ADN non muté et qui en révélant les bases désappariées, indique le site de la mutation.

Tissu-spécifique : définit l'expression d'un gène ou la présence d'une molécule se manifestant uniquement dans un tissu ou un type cellulaire particulier.

Toit optique (ou **tectum**) : structure cérébrale dérivant de la partie dorsale du cerveau moyen embryonnaire, le mésencéphale, constituant un centre d'intégration et de relais pour de nombreuses informations, en particulier pour les informations visuelles chez les vertébrés autres que les mammifères.

Totipotent : se dit de la capacité d'une cellule à donner naissance à un nouvel organisme. La seule cellule vraiment totipotente est le zygote, qui est à l'origine de l'embryon et de toutes ses structures annexes, dont le placenta chez les mammifères. Chez les plantes, les cellules somatiques demeurent potentiellement totipotentes, étant capables de former une nouvelle plante dans le cas où elles sont cultivées dans des conditions appropriées.

Traduction : processus par lequel un ARN impose l'ordre des acides aminés au sein d'une protéine au cours de la synthèse protéique s'effectuant au niveau des ribosomes.

Transcription : processus consistant en la copie de la séquence de l'ADN d'un gène en une séquence d'ARN complémentaire. Pour certains gènes, l'ARN est le produit final, mais pour des gènes codant des protéines, l'ARN est ensuite traduit pour produire une protéine.

Transdétermination : processus par lequel une cellule engagée dans une voie de différenciation, mais non encore différenciée, est finalement déterminée en un type cellulaire différent. Les événements rares conduisant aux transformations homéotiques d'une structure adulte en une autre dans les disques imaginaux en régénération de drosophile sont les exemples les mieux connus de transdétermination.

Transdifférenciation : processus au cours duquel une cellule différenciée se dédifférencie puis se redifférencie en un type cellulaire différent.

Transdifférenciation induite : technique potentiellement exploitable en médecine régénérative, fondée sur la conversion de cellules différenciées en un autre type de cellules différenciées. La transdifférenciation de cellules de foie de souris en cellules productrices d'insuline a été obtenue expérimentalement.

Transduction du signal : processus par lequel une cellule convertit un signal extracellulaire reçu sous une certaine forme, telle la liaison d'une molécule à un récepteur de surface, en un signal intracellulaire d'une forme différente, telle que la phosphorylation d'une protéine cytoplasmique.

Transfection : technique par laquelle des cellules de mammifères ou d'autres espèces animales sont amenées à recevoir des molécules d'ADN étranger. Ces ADN s'insèrent parfois de manière permanente dans le génome des cellules hôtes.

Transfert de noyau de cellule somatique (ou **transfert de noyau somatique**) : clonage d'un animal par le transfert du noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé et développement de cet œuf dans un nouvel individu. L'embryon obtenu a la même constitution génétique que la cellule somatique donneuse.

Transformation homéotique : voir Homéose.

Transgène : gène provenant parfois d'un organisme étranger, qui a été introduit dans une cellule ou un organisme par des techniques d'ingénierie génétique.

Transgénique : décrit un organisme dont le patrimoine génétique a été modifié délibérément en introduisant un nouvel ADN, par exemple un nouveau gène, un gène avec des mutations spécifiques, ou des ADN causant l'inactivation de gènes spécifiques. Ce terme est aussi employé pour qualifier les diverses techniques d'ingénierie génétique relative à ces manipulations génétiques.

Transgenèse somatique (ou **transgenèse transitoire**) : introduction directe d'un ARNm ou d'une construction ADN dans des cellules somatiques pour évaluer les effets d'une surexpression d'un gène.

Transgenèse transitoire : voir Transgenèse somatique.

Transition blastuléenne : chez les embryons d'amphibien, stade du développement à partir duquel les gènes zygotiques commencent à s'exprimer, les divisions devenant asynchrones et les cellules de la blastula mobiles.

Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : processus au cours duquel des cellules épithéliales, en n'étant plus adhérentes entre elles, se détachent de l'épithélium et sous forme de cellules isolées, acquièrent un phénotype de cellules mésenchymateuses.

Transition mésenchymato-épithéliale (TME) : processus par lequel une agrégation de cellules mésenchymateuses conduit à la formation d'une structure épithéliale. Ceci s'observe lors de la formation de certaines structures tubulaires comme par exemple les tubules rénaux ou les capillaires sanguins.

Transposon : séquence d'ADN qui peut être insérée dans un site différent dans un chromosome, soit par l'insertion d'une copie de la séquence originale soit par excision et réinsertion de la séquence originale.

Triploblastique : qualifie un animal possédant trois feuillets embryonnaires, endoderme, mésoderme et ectoderme.

Trisomie : présence d'un chromosome en trois exemplaires, au lieu du nombre deux normal, et qui est caractéristique de certains états particuliers, comme le syndrome de Down.

Trompes de Fallope : nom donné aux oviductes des mammifères.

Trophectoderme : couche cellulaire externe des embryons précoces de mammifères. Il est à l'origine de structures extra-embryonnaires tel le placenta.

Trophectoderme mural : partie du trophectoderme qui n'est pas en contact avec les cellules de la masse cellulaire interne.

Trophectoderme polaire : région du trophectoderme au contact de la masse cellulaire interne du blastocyste de mammifère.

Trophoblaste primaire : couche de cellules géantes qui envahit la paroi l'utérine lors de l'implantation d'un blastocyste de mammifère.

Tube neural : structure tubulaire d'origine ectodermique résultant de la fermeture dorsale de la gouttière neurale et donnant naissance au système nerveux.

Valeur de position : propriété acquise par une cellule en relation avec sa position par rapport aux limites d'un champ d'information de position. La cellule interprète alors cette valeur de position en fonction de sa constitution génétique et de son historique, et se développe en conséquence.

Vasculogenèse : étapes initiales de la formation des vaisseaux sanguins, comportant une condensation des angioblastes pour former un vaisseau tubulaire.

Ventricule : voir Chambre ventriculaire.

Vernalisation : phénomène par lequel la floraison est accélérée après que la plante a été exposée à une longue période de basses températures.

Vésicule optique : structure à l'origine de la rétine de l'œil des vertébrés et qui dérive de la paroi du diencéphale.

Vésicule synaptique : petite vésicule délimitée par une membrane et remplie d'un neurotransmetteur, située dans la terminaison axonale d'un neurone. La libération de son contenu dans la fente synaptique s'effectue quand un potentiel d'action (influx nerveux) généré au niveau du corps cellulaire arrive au niveau de la terminaison.

Vésicule vitelline : annexe extra-embryonnaire formant une cavité interne chez les oiseaux et les mammifères. Chez les oiseaux, cette cavité contient du vitellus.

Voie (canonique) Wnt/\beta-caténine : voie de signalisation intracellulaire stimulée par les membres de la famille de protéines de signalisation Wnt qui conduit à la stabilisation de la β -caténine et à son entrée dans les noyaux où elle agit en tant que co-activateur transcriptionnel.

Voie extrinsèque apoptotique : mort cellulaire programmée induite par une molécule signal extérieure interagissant avec des récepteurs membranaires à domaine de mort.

Wingless : protéine secrétée de signalisation chez la drosophile ayant un rôle dans l'organisation des segments et la formation des ailes. Elle appartient à la famille des protéines de signalisation Wnt.

Zona limitans intrathalamica : centre de signalisation localisé dans le cerveau antérieur, le prosencéphale, des embryons de vertébrés, qui participe à la mise en place du patron d'organisation du cerveau suivant l'axe antéro-postérieur.

Zone à activité polarisante (ou ZPA pour *Zone of Polarizing Activity*) : région située à la marge postérieure des bourgeons des membres des vertébrés, qui produit un signal spécifiant les positions le long de l'axe antéro-postérieur.

Zone de détermination progressive : dans le modèle chronologique du développement des membres de vertébrés, zone située à l'extrémité distale du bourgeon où les cellules acquièrent leurs valeurs de position.

Zone du manteau : couches constituées par des corps neuronaux hors de la couche ventriculaire, qui sont formées suite à une migration neuronale.

Zone marginale : (1) région ceinturante de mésoderme présomptif localisée au niveau équatorial de la blastula tardive de l'embryon d'amphibien. (2) couche la plus externe du tube neural lors du développement du cortex. **Zone marginale postérieure :** région cellulaire dense à la limite du blastoderme de l'embryon de poulet à partir de laquelle prend naissance la ligne primitive.

Zone médiane du fuseau : désigne la zone de chevauchement des extrémités des microtubules constituant les deux moitiés d'un fuseau de division. Sa position sur le grand axe de la cellule prédit l'emplacement du plan de division.

Zone pellucide : couche de glycoprotéines entourant l'ovule de mammifères qui joue un rôle dans la prévention de la polyspermie. Elle constitue une structure analogue de la membrane vitelline observée chez d'autres espèces animales.

Zone souche : chez les embryons d'oiseaux et de mammifères, zone en arc de cercle de cellules épiblastiques s'auto-renouvelant et disposées de chaque côté de la ligne primitive, juste en arrière du nœud en cours de régression, qui sont à l'origine du tube neural troncal et de la partie médiane somitique.

Zone sous-ventriculaire : dans le tube neural, couche cellulaire où les progéniteurs quittant la zone ventriculaire peuvent proliférer. Chez l'adulte, la zone sous-ventriculaire est l'une des deux zones où se trouvent des cellules souches assurant une neurogenèse.

Zone ventriculaire : couche de cellules prolifératives bordant la lumière du tube neural chez les vertébrés, à partir de laquelle sont générés les neurones et les cellules gliales.

Zootype : profil d'expression des gènes Hox et d'autres gènes le long de l'axe antéro-postérieur embryonnaire qui est caractéristique de tous les embryons d'animaux.

Zygote : œuf fécondé. Cellule diploïde réunissant les chromosomes des gamètes des deux parents, mâle et femelle.

Index

A

acétylcholine 555 récepteur 555,556 achéiropodie 463 achondroplasie 584 acide hyaluronique 474 acide rétinoïque 204, 206, 207, 210,211, 220, 319, 320, 456, 462, 506 régénération des membres 604-607 acrosome 425 actine 368 activateurs 313 activine 157, 160-164 actomyosine 368 adhérence cellulaire 362-369 adhérence différentielle 363 différenciation tissulaire 363-364 molécules d'adhérence cellulaire 17, 362, 363.365 neurulation 394 formation des synapses 557 régénération 604, 605 transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) 367, 369 mésenchymato-épithéliale (TME) 367, 369 ADN analyse par puces à ADN 127, 128 méthylation 316-318, 320 mitochondrial 428 régions cis-régulatrices 19 réparation 615, 616 transition blastuléenne 158, 159 Agrobacterium tumefaciens 280, 281 aile (développement) comparaisons évolutives 642, 643 drosophile 87, 476-483, 574-576, 637, 638 établissement des axes 478-481 frontières de compartiments 78, 79, 83-87, 477-481 papillon 636-638 motifs alaires 485, 486 poulet 642-643 (voir aussi développement du membre des vertébrés) (voir aussi signalisation Wnt) aire opaque 115, 116 pellucide 115, 116 allantoïde 118, 119 allèles 11, 12, 126, 244, 303, 416, 439, 440, 582

Ambystoma mexicanum 594, 601, 651, 652 punctatum 571 tigrinum 571 AMH (hormone anti-müllérienne) 431, 432 amniocentèse 125 amnios 118, 119, 125 amnioséreuse 44 amniotes 106 amphibien carte des territoires présomptifs 153 détermination de l'œil 23 gastrulation 109, 383-388 métamorphose 588, 589, 592, 593 neurulation 109, 110 régénération des membres 595, 597-605 influence nerveuse 602, 603 système visuel 551 (voir aussi xénope) Amphimedon queenslandica 627 amphioxus 629, 630, 632, 639, 646 anamniotes 106 androgénotes 420-422 anémie falciforme 330, 331 anencéphalie 396 angioblastes 502, 503 angiogenèse 502-504 angiospermes 275, 276, 284, 302 aniridie 494 anomalies congénitales 2 Antirrhinum 296, 299, 300 apoptose 238 expression Astyanax 645, 646 drosophile 238, 574-576 hvdre 597 mammifères 238 nématodes 237, 238 mort cellulaire neuronale 559 séparation digitale 475 voies et facteurs apoptotiques 238, 559 arabette (voir A. thaliana) Arabidopsis thaliana (arabette) 2, 9, 10, 273, 274 axe apico-basal 275, 278-280, 293 axes foliaires 289, 290 carte des territoires présomptifs 277, 292 centre organisateur 284, 285 cycle vital 274, 275 développement embryonnaire 275-283 développement floral 295-299, 302

amas proneuraux 533-536

contrôle de la floraison 300, 302 rôle des gènes homéotiques 296-299 dilatation dirigée foliaire 281 fécondation 274, 275, 302 germination 275 méristèmes 284 devenir cellulaire 285-288 cellules souches 284, 285 tissus racinaires 292-294 araignée 635, 638 arcs branchiaux 525 changements évolutifs 647, 648 expression des gènes Hox 225 migration des cellules des crêtes neurales 224, 225 xénope 110 archentéron 109, 228, 378-381, 383, 384, 386 ARF (facteur de croissance à l'auxine) 278, 279 Aristote 3, 22 ARN 18 ARNseq 127, 128 anti-sens 19, 241 morpholino 19, 139 épissage alternatif 18 interférent (ARNi) 19, 139, 241 messager (ARNm) 18 vasa 413 non-codant 422 polymérase II 313, 314 ribosomique (ARNr) 32, 419 transfert (ARNt) 38 artémie 636 artères 503 arthropodes évolution 634-639 mue 589 articulation (formation) 474, 475 Astyanax mexicanus 494, 645, 646 asymétrie gauche-droite 226-229 Caenorhabditis 243, 244 oursin 264 poisson-zèbre 227, 228, poulet 228, 229 souris 227, 228 xénope 227, 228 populationnelle 335-336 autisme 558, 586 auxine développement racinaire 293 disposition foliaire 290-292

gradients 278-280 voie de signalisation 278 axes adaxial-abaxial 289, 290 animal-végétatif oursin 255, 256, 260, 261 xénope 107, 145, 146 poisson-zèbre 175 antéro-postérieur 14, 15 Caenorhabditis elegans 239-242, 247, 248 cerveau 523, 524, 533 drosophile (dont œuf) 46-51, 55-58, 66 formation somitique 208-213 membres 447, 448, 451-454, 456-458, 461,465 moelle épinière 532 poulet 186-188 souris 192, 193 vertébrés 103, 167-169, 206 xénope 172, 173 (voir aussi axes corporels) apico-basal 14 corporels Caenorhabditis 239-244, 253 disque de patte 483-485 drosophile 44-53 mise en place 14, 15 modèle du double gradient 170 poisson-zèbre 175 poulet 186-188, 198, 199 souris 192, 193 vertébrés 145-154, 206 xénope 145-152 dorso-ventral arthropodes 638, 639 Caenorhabditis 242-244 drosophile (corps, œuf, aile) 51-53, 60-64, 481 membre (vertébrés) 447, 448, 453, 464, 465 poulet 187 vertébrés 103, 206 xénope 149-152 (voir aussi axes corporels) oral-aboral (oursin) 255, 260, 261, 263, 264 proximo-distal aile (drosophile) 483 disque de patte (drosophile) 483-485 feuilles 289, 290 membre de vertébrés 447, 448, 451-456, 465, 468 régénération 603-607 axolotl 594, 601, 602, 651, 652 axones 521 cône de croissance 545, 546, 550, 556 navigation 544-553 guidage 545-549 franchissement de la ligne médiane 549, 550

В

baleine 642, 643, 651 β-caténine 148-152, 315 planaires 599 oursin 259, 260, 262, 264 β-globine (expression génique) 330-332 β-neurexines 557 bilatériens 625-627 blastème 598-605, 608 blastocœle 4, 5, 108, 374, 375, 377, 379, 383 accumulation de liquide 375, 376 blastocyste 120, 121, 125, 136, 137, 190-192, 375 blastoderme 112, 114, 115, 196 axe antéro-postérieur (poulet/souris) 186-188 syncytial (drosophile) 38, 45, 46 blastomère 108 ablation 132 spécification 189, 190 blastopore 8, 108, 383, 384, 386 blastula 4, 5, 108, 145, 369, 371, 373, 375, 427 agencement cellulaire 371 carte des territoires présomptifs 153, 154 formation 373-376 blocage de la polyspermie 426, 427 boîte E 324 MADS 297, 299 T 162 Bolitoglossa 651 boucle rétroactive (voir rétrocontrôle) bourgeon(s) caudal (xénope) 110, 111 membres 447, 451, 641, 650 auto-organisation 471 croissance 452, 453 organisation 454 (voir aussi développement des membres des vertébrés) nageoires 640 bourgeonnement (voir hydre) bourrelets endocardiques 506 Brenner, Sydney 236

C

Caenorhabditis, 9, 10, 236-253, 627 anatomie 237 axes corporels 239-244, 253 antéro-postérieur 239-242, 247, 248 dorso-ventral 242-244 identité de position 247-248 chronologie du développement 248-249 clivage (ou segmentation) 237 compensation de dose 438-440 cycle vital 236 destinée cellulaire 239, 240 spécification 244-246 détermination du sexe 430-438

développement mosaïque 24 vulvaire 250-253 fermeture ventrale 401 gènes Hox 247, 248 du développement 19 génome 239 larve 237, 239 lignage cellulaire 239, 240, 248, 249 stade dauer 614 transdifférenciation 346 vieillissement 613-616 caille 129, 130, 198, 199, 225 canalix déférents 431, 432 de Müller 431, 432 de Wolff 431, 432 cancer 576-578 colorectal 578 pancréatique 577 rétinoblastome 577 capillaires sanguins 502, 503 Capsella 276 cardiomyocytes 505, 507, 609, 610, 612 carte des territoires présomptifs Arabidopsis 277, 288, 292 Caenorhabditis 239, 246, 247 disques imaginaux (drosophile) 478, 484 oursin 257, 258 plantes 287, 288 vertébrés 196 amphibiens 129, 130, 153, 154 poisson-zèbre 175, 176 poulet 130, 131, 195 souris 195 (voir aussi destinée cellulaire) cartilage 473, 474, 584-586 de conjugaison 584, 585, 587 cartographie devenirs cellulaires crêtes neurales 223, 226 somites 221-222 tecto-rétinienne 551-553 affinement 560, 561 caspase 238 caténines 365 cavité proamniotique 192 Cdk 572 Cdk4 324 cellules cancéreuses 2, 576-578 cartilagineuses (voir chondrocytes) d'amplification transitoire 335 des crêtes neurales 109, 186 migration 223-226, 397-399 en bouteille 383, 384 folliculaires 55-58, 419 germinales 59, 409 différenciation des cellules germinales 410-423 interactions cellule-cellule 413-414

spécification 411-414, 423 méiose 416-419 migration gonadique 414-416 primordiales 59, 410 gliales 520, 556, 557 radiaires 540 initiales 284, 287 nourricières 55, 58, 419 (de) Paneth 336, 337 polaires 411 progénitrices 335-336 sanguines 325-332 satellites 338, 587 somatiques 5 potentiel régénératif (plantes) 280 souches 2 division asymétrique 31-33, 328 embryonnaires (ES) 31, 135-137, 189, 339-342, 348-354 épiblastiques (epiSC) 341, 342 épidermiques 332-336 épithéliales intestinales 336-338 formation des cellules sanguines 325-328 méristématiques 284, 285 modalités de division 334-336 multipotentes 31, 224, 325-327, 339 musculaires 338 neurales 536, 538, 540 pluripotentes 31, 188, 340, 349, 350 pluripotentes induites (iPS) 349-355 potentialité en médecine régénérative 348-352 centre(s) de Nieuwkoop 151-153 quiescent 292, 293 de signalisation 151, 152 (voir aussi organisateur) visuels 550-553, 560, 561 centrosomes 370-372 céphalocordés 629-632, 646 céphalopodes 647 cerveau antérieur (voir prosencéphale) centres de signalisation 522-525 visuels 550-553, 560, 561 développement 522 moyen (voir mésencéphale) neurones corticaux 541 postérieur (voir rhombencéphale) rôle des gènes Hox 527, 528 chambre ovarienne 55-58 chiasma optique 551, 552 chimères 24, 130, 136, 137, 189 mériclinale 287 périclinale 286-287 ChIP-chip/seg 140 choanoflagellés 628 chondrocytes 584-587 chorde 106, 387

dilatation dirigée 402 devenir des cellules somitiques 221, 222 poulet 116-118, 200, 201 xénope 387-389 chorion 118, 119 chromatine 200, 439 régulation de l'expression génique 316-319 techniques d'immunoprécipitation 139, 140 chromosome(s) polytènes 592 X 430 inactivation 438-440 Y 430, 431 cil primaire 462, 466, 467 ciliopathies 227, 467 clivage (ou segmentation) 4-6, 14, 369-372 Caenorhabditis 237 drosophile 39 humain 124, 125 oursin 254, 256, 263, 264 plan (de) 370-372 radiaire 369-370 sillon de division 370-373 spiral 369, 370 vertébrés 104 poisson-zèbre 111, 112 poulet 114, 116 souris 119, 121, 188 xénope 14, 108 clonage 344 mammifères 345 thérapeutique 350, 351 transfert nucléaire 344, 345 cnidaires 625-627 co-activateurs 315 code Hox 218 cœur 504-507 régénération mammifères 610-612 poisson-zèbre 594, 609-612 colinéarité (voir gènes Hox) colliculus supérieur 551, 553 colonne de dominance oculaire 560, 561 motrice latérale (CML) 531, 548, 549 compaction 374, 375 compartiments 79, 80, 83-87 compensation de dose 438-440 complexe de remodelage de la chromatine 200, 202 complexité cellulaire 32, 33 condensation 448 connexité par chimioaffinité (hypothèse) 552 constriction 368, 371, 380, 381, 384, 389 contraction 368, 379 cellules hypodermiques 403 convergence dorsale 387 co-répresseurs 315 cornée 491, 492

corps genouillé latéral (CGL) 551, 560 corpuscule de Barr 439 cortex visuel 551, 561 corticolibérine (ou CRH) 592 couche hyaline 373 craniorachischisis 396 Cre/loxP (système) 137, 138 Crête(s) apicale ectodermique (AER) 447, 448, 450 rôle dans le développement des membres 450-452 génitales 413, 414 neurale (structures dérivées) 224 neurale antérieure (CNA) 523, 524 organisation du cortex cérébral 524, 525 criblage génétique expressions géniques défectueuses 69, 70 gènes du développement (drosophile) 41-44 mutagenèse (poisson-zèbre) 133, 134, 177 préimplantation 126 CRISPR/Cas9 (système) 137, 138 cristallin 647 apoptose 645-647 formation 494 placode 490, 491 régénération 347, 348, 594 cristallines 647 croissance 16, 569-588 agrandissement cellulaire 570, 571 contrôle de la taille d'un organe 578-580 coordination des processus 574-576 effets de la nutrition 587, 588 hydre 596 intercalaire 604, 607-609 larvaire 589-592 mue 589-591, 594 muscle 580, 587 osseuse 583-587 par accrétion 570, 571 tissulaire 571 croissant de Koller 115, 116, 187-189, 197, 200 crustacés (appendices pairs) 634-637 cténophores 625-627 CXCR4 (voir récepteur) cycle cellulaire, 7, 572, 573 points de contrôle 572 régulation 572, 573 cycles vitaux 613, 653 Arabidopsis 274, 275 Caenorhabditis 236 drosophile 38-44, 653 évolution 653 oursin 255, 652, 653 vertébrés 104-106 homme 123, 124 poisson-zèbre 111 poulet 115 souris 120 xénope 107 (voir aussi métamorphose)

cyclines 572 cyclopie 28, 493 cytokinines 273, 289, 292, 293

D

Darwin, Charles 623, 625, 646 DCC (voir récepteur) dédifférenciation 325 régénération des pattes 595, 597-602 délamination 389 dendrites 520 dents 507-510 dermomyotome 221, 222 desmosomes 365 destinée (ou devenir) cellulaire 22, 23 Caenorhabditis 239, 240 spécification 244-246 cellules germinales 411-413 méristèmes 285-288 oursin 257, 258 somites 220-222 (voir aussi cartes des territoires présomptifs ; cartographie) déterminants cytoplasmiques 6, 30-32 denticules 41, 79, 81-83, 85, 87 détermination 22, 23, 154, 311 cellulaire 22, 23 (de) l'œil d'amphibien 23 taille corporelle (chien) 582 du sexe 430-431 Caenorhabditis 435-438 constitution génétique et signaux intercellulaires 436-438 drosophile 433-435, 437 mammifères 430-433, 436, 437 deutérostomiens 254, 627, 639 développement à bandelette germinative longue 75, 76, 653 à bandelette germinative courte 76, 653 à régulation 23, 24, 235 oursin 257, 258 (voir aussi régulation) comparatif des stades (vertébrés) 105 contraintes 643 gènes 19 contrôle, modules cis-régulateurs 17-21 criblage génétique 41-44 (voir aussi gènes spécifiques) mosaïque 6, 24, 235 effet de l'inactivation de X 439, 440 œil 490-494 rôle du gène Pax6 493, 494, 497, 646, 647 pulmonaire 499-500 vulve (Caenorhabditis) 237, 239, 250-253 développement des membres de vertébrés 447-476 axes 447, 448 information de position 454-461, 465

cartilage, muscles et tendons 473, 474 doigts 462-464, 475 polydactylie 462, 463, 470 formation articulaire 474, 475 guidage neuronal 548-549 localisation et type de membre 449-451 mise en place du patron 454-459, 461, 467-471 auto-organisation 471 signalisation intégrée 465-466 muscle 473 modèles basés sur le temps et à deux signaux 454-456 os longs 583-587 région de polarisation 457 (voir aussi zone d'activité polarisante) rôle de l'apoptose 475 de la crête apicale ectodermique (AER) 451, 452 des gènes Hox 449, 450, 468-470, 473 des gènes Pax 473 de Sonic hedgehog (Shh) 451, 461, 462, 465-467, 470 zone de détermination progressive 454, 455 développement végétal 272-274 développement embryonnaire 275-283 développement floral 295-304 rôle des gènes homéotiques 296-299 disposition foliaire sur tige 290-292 méristèmes 283-295 devenir cellulaire 285-288 cellules souches 284, 285 capacité régénérative 280 poils absorbants racinaires 294 tissus racinaires 292-294 (voir aussi Arabidopsis thaliana) Dharma (voir facteurs de transcription) diabète 352, 353, 355 différenciation cellulaire 16, 310-312 Caenorhabditis 246-247 effet de la fusion cellulaire 346 évolution 629 membre des vertébrés 448 modèles 322-343 cellules sanguines 325-332 épithélium 332-338 muscle 322-325 moelle épinière 528-531 réversibilité 343-345 dédifférenciation 325, 595, 597, 600-602 terminale 311 dilatation dirigée chorde 402, 403 croissance végétale 281, 282 élongation embryonnaire (nématodes) 403 diploblastiques 626 diploïdie 6, 11, 416

disques imaginaux (drosophile) 41, 42, 79, 83, 87, 476, 477, 483-488 aile 477, 478 détermination de la taille alaire 574, 576 patte 483-485 valeurs de position 486-488 divisions cellulaires anticlinales 278 asymétriques 30-32, 236, 372 Caenorhabditis 239-242, 244-246 cellules souches 31, 33, 328 neurogenèse 536-538 oursin 254 taille cellulaire 372 contrôle et coordination (aile de drosophile) 574, 576 différenciation (lien avec) 311 périclinales 278 (voir aussi mitose, méiose) symétriques 372 doigts longueurs 586 séparation par apoptose 475 polydactylie 462, 463, 470 spécification identitaire 462-464 dominance (ou prévalence) postérieure 94, 218 dommage oxydatif 615 Driesch, Hans 7, 8, 254, 263 Drosophile 2, 3, 8-10, 37, 38, 627, 653 ailes développement 87, 476-478, 574-576, 637.638 gène vestigial 481-483 limites des compartiments 83-87, 477-481 patron de l'organisation 481, 483 signaux de position 478-480 apoptose 238 axes antéro-postérieur 46-51, 55-58, 66 corporels 44-53 dorso-ventral 51-53, 60-66 blastoderme syncytial 38, 44, 46 cellules polaires 40 clivage (ou segmentation) 39 cœur 507 compensation de dose 438, 440 criblage des expressions géniques défectueuses 69, 70 croissance 571, 574-576 cycle vital 38-44, 653 déterminants cytoplasmiques 31 détermination du sexe 433-435, 437 développement cellules germinales 411, 412, 416 oculaire 646 pattes 476, 477, 483-485, 487, 637 disques imaginaux 41, 42, 79, 83, 87, 476, 477, 483-485, 487-488, 574, 576 expression génique ciblée 70

extension de la bandelette germinative 40, 41, 382, 383 fermeture dorsale 400, 401 guidage des axones 558 gastrulation 40, 41, 380-383 gènes à effets maternels 44, 46-53 Hox 91-94, 215, 486, 487, 632 individu transgénique 69 larve 41 mésoderme 40, 44, 63 invagination 380, 381 métamorphose 41, 42, 477, 484, 590-592 neurogenèse 533-536, 538, 539, 544 œil composé 494-497 ovogenèse 54-60 polarité antéro-postérieure 55-58, 61 polarité dorso-ventrale 60-61 réorganisation cytosquelettique 58, 59 patron d'organisation embryonnaire 61-71 denticules 41, 79, 81-83, 85, 87 dorso-ventrale 461 gènes impliqués 97 plan corporel 635 polarité planaire cellulaire 87-89, 382, 383 région céphalique 94, 638 régulation cycle cellulaire 573-574 expression génique 312-318 segmentation (métamérisation) 40, 41 compartiments 78-80, 83-87 expression des gènes de segmentation 77-90 mise en place parasegmentaire 71-77 spécification de l'identité segmentaire 90-95 stabilisation des frontières parasegmentaires 79, 81, 83 signaux intercellulaires 58 soies sensorielles 537 spécification organes sensoriels 537 régions terminales 50, 51 système trachéen 500, 501 duplication génique 630-632

E

ecdysone 320, 589-592 échinodermes 254 (*voir aussi* oursins) ectoderme 4, 5, 15, 152 développement des membres (rôle) 464, 465 drosophile 40 extraembryonnaire (souris) 121, 193 oursin 257-260, 263, 264 vertébrés 104, poisson-zèbre 112, 113, 176, 177 poulet 115 souris 121-123 xénope 152-155

ectomésenchyme 223, 525 écusson (poisson-zèbre) 111, 112, 175, 177, 178 Edwards, Robert 126 effet de communauté 157, 158 EGF (facteur de croissance épidermique) 147 EGFR (voir récepteurs) Elbows (voir facteurs de transcription) électroporation 131 élément P 69, 70 Eleutherodactylus 652 embryogenèse 2, 3 changements morphologiques (espèce humaine) 16 nutrition embryonnaire (effets) 587, 588 programme générateur 31 stade phylotypique 623, 630 embryologie 3 embryons dorsalisés/ventralisés (drosophile) 53.63 empreinte génomique 318, 420-423 plantes 303 endoblaste 188 endocarde 504 endoderme 4, 5, 15, 152 Caenorhabditis 245, 246 drosophile 40 vertébrés 104 poisson-zèbre 112, 113, 176, 177 poulet 115 souris (primitif) 120, 190-192 xénope 153-155, 172, 386 viscéral 121 antérieur (EVA) 192-194, 197, 198 distal (EVD) 192, 193 postérieur 197 endomésoderme 112, 113, 176 spécification (oursin) 258, 260, 265 endothélium 498 enhancers 313, 469, 482, 634, 641, 644, 650 enhancer trap 70 Eph (voir récepteurs) éphrines 147, 395, 546, 548, 553 épiblaste 113-117, 120-123, 125, 190, 191, 195, 197, 389-391 mouvement de polonaise 390, 391 cellules souches (epiSCs) 341, 342 épibolie 383, 386 poisson-zèbre 112, 386-388 xénope 109, 383 épicarde 504, 506 épiderme 332-336 épigenèse 3, 420 épimorphose 595, 605 pattes (amphibiens, insectes) 595, 608 planaires 599 épinoche (structures pelviennes) 644, 645

ectodermine 154-156

épithélium(s) 498-500, 576 intestinal 336-338 stomodéal 507-509 tubulaire pulmonaire 500 éponges 625, 627 équivalence génétique 19 érythrocytes 326-332 espace périvitellin (drosophile) 51 espèce humaine cavité amniotique (expansion) 125, 127 cellules souches embryonnaires (ES) 352-355 clivage (ou segmentation) 124, 125 croissance 583-585, 587 doigts 586 effets de la nutrition 587, 588 cycle vital 123, 124 détermination du sexe 430, 432, 433 développement embryonnaire 105, 123-125 changements morphologiques 16 fécondation 123, 124 gastrulation 125 membre (anatomie comparée) 642 ovocyte 124 régénération des extrémités digitales 607 étoile de mer 594, 595 euchromatine 202 expression génique 18 analyses par puces à ADN et ARN seq 127, 128 changements évolutifs 624, 625 contrôle 17-21, 312-321 boucles rétroactives (voir rétrocontrôle) modifications de la chromatine 316-319 régulateurs transcriptionnels 313-316 signaux externes 319-320 criblage des expressions incorrectes 69, 70 différentielle 19 localisation dans l'embryon 20 plasticité 343-355 région de contrôle 202 rhombencéphale (gènes Hox) 527, 528 synthèse protéique 17-19 (voir aussi gènes spécifiques) extension bandelette germinative (drosophile) 40, 41, 382, 383 convergente gastrulation 380, 383-388, 391 neurulation 394 extinction génique (gene knockdown) 13, 139, 241, 316 par microARN 249, 250 évolution 33, 623-626 convergente 645 chronologie des processus 649-654 (du) développement 626-629 gastrulation 629

modifications du développement 629-649 ailes 642, 643 changements fonctionnels 647, 648 duplication génique 630-632 évolution adaptative 645, 646 gènes Hox 630-638 membres 639-643 nageoires en membre chiridien 639-641 origine des multicellulaires 628-629 parallèle (yeux) 646-647

F

facteurs de croissance 329, 572, 573 de l'endothélium vasculaire (voir VEGF) de type insuline (voir IGF1/2) épidermique (voir EGF) fibroblastique (voir FGF) hématopoiétique 329 nerveuse (voir NGF) neuréguline-1 556 transformant- β (voir TGF- β) de réponse à l'auxine (voir ARF) de transcription 21, 313-316, 318, 319 différenciation des cellules sanguines 328, 329 général 313, 314 tissu-spécifiques 315-316 blastula de xénope 162, 163 de transcription cités Dharma, 175, 176 Elbows 477 Fox1e/Q2/A2 155 ; 264 ; 353 Gal4 70 GATA1 328, 329, 331 Gata6 190, 191 Gbx2 523, 524 Krox20 526, 527 MEF2 297 Msx1 601 Nanog 190, 191 Neurogénine 538, 539 No-ocelli 477 VegT 146, 152, 155, 156 Oct4 189-191, 350, 353 Pdx1 353, 354 Pitx1/2 450, 468 ; 264, 506 Prx1 650 PU.1 328, 329 Scalloped 482, 576 Scleraxis 222 Slug 397 Snail 397 TCF 315 TCF3 178 TFIID 325 dorsalisant 149, 150, 166 inhibiteur de leucémie (voir LIF) maternels drosophile 46-61

poisson-zèbre 175 xénope 145, 146, 149 neurotrophe dérivé de la glie (voir GDNF) promoteur de maturation/mitose (voir MPF) stimulateur de colonies (CSF) 329 de granulocytes (voir G-CSF) de granulocytes-macrophages (voir GM-CSF) de macrophages (voir M-CSF) fécondation 5, 424-429 activation ovulaire 427-429 Arabidopsis 274, 275 espèce humaine 123, 124 interactions cellulaires de surface 424-426 in vitro (FIV) 124, 126, 426 oursin 426-428 prévention de la polyspermie 426, 427 xénope 107, 146, 149, 150, 426, 428, 429 fermeture dorsale (drosophile) 400, 401 ventrale (poulet, Caenorhabditis) 117, 401 fente synaptique 555, 556 feuilles axes 289, 290 morphologie foliaire 282 disposition sur la tige (phyllotaxie) 290-2.92 primordium/a 289-291 feuillets embryonnaires 5, 15, 16 poisson-zèbre 175-177 poulet et souris 193, 195, 196 xénope 152-164 (voir aussi ectoderme ; mésoderme ; endoderme) FGF (facteur de croissance fibroblastique) 147, 197, 584, 639 développement neural 171, 172, 532 membre de vertébrés 450-452, 456, 465-467 FGF-4 453 FGF-8 453, 523, 524 FGF-9 431, 432 FGF-A 379 FGFR (voir récepteurs) formation somitique 210, 211 fibroblastes 311, 420, 506 différenciation musculaire induite 366 effet du vieillissement 615, 616 filaments d'actine (voir microfilaments) intermédiaires 368 filopodes Caenorhabditis 401 drosophile 400 oursin 379-380 formation des synapses 557 fleurs 295, 296 développement 296-300, 302-304 contrôle de la floraison 300-302

foie (*voir* régénération) 578, 579, 594 Fox (*voir* facteurs de transcription) Frizzled (*voir* récepteurs) fuseau de division mitotique 370-373 fusion cellulaire 346

G

G-CSF (facteur stimulateur de colonies de granulocytes) 329, 330 gamètes 409, 410 ganglions rachidiens 398, 399 Gasterosteus aculeatus 644, 645 gastrula 16, 196, 197, 493, 629, 652 amphibien (xénope) 23, 109, 114, 149-151, 154, 160, 162, 163, 166-173, 200, Caenorhabditis 246, 247, drosophile 534 oursin 364, 386, 388 poisson-zèbre 175-178 souris 200 gastrulation 4, 5, 16, 196 drosophile 40, 41, 380-383 évolution 629 mouvements 377-392 oursin 16, 254-256, 377-380, 392 vertébrés 104, 383-391 homme 125 poisson-zèbre 112, 113, 386-388, 392 poulet 113, 114, 389-391 souris 113, 120-123, 195, 389, 391 xénope 108, 109, 145, 153, 165, 167-169, 173, 174, 383-389, 392 GDNF (facteur neurotrophe dérivé de la glie) 560 gène(s) 9, 13 à autonomie cellulaire 24 à effet cellulaire non autonome 24 à effet maternel 44 à homéoboîte (homéogènes) 214 développement du système nerveux 530 plantes 279 spécification de l'identité dentaire 507-510 (voir aussi gènes homéotiques ; gènes Hox) cités achaete 535, 537 Antennapedia (Antp) 93, 486, 487, 632 atonal 496 Barx1 508, 509 BRCA1 126 ceh-13 247 CLAVATA (CLV) 285 CYCLOIDEA 300 Cyp26a1 220 daschund 485 Deformed 93 Dlx2 508, 509 engrailed 478, 479 eyeless 495, 497, 646 fem 438 FILAMENTOUS FLOWER (FIL) 290 FLORICAULA (FLO) 296, 300 fog 438

fruitless 435 H19 422 hairy 75, 210 homothorax 485, 487 ihh 584 Iroquois (complexe) 496 labial 638 mab-5 247, 248 miles apart 505 MONOPTEROS (MP) 279 MSL (complexe) 440 oskar 54, 58, 59, 61, 411, 412 p53 577, 578 pha-4 247 PHABULOSA (PHAB) 290 PHAVOLUTA (PHAV) 290 Pitx1/2 644, 645 Polycomb (famille) 93, 303, 337, 422 Raldh2 207, 220 REVOLUTA (REV) 290 SALL 459, 464 SCARECROW 293, 294 scute 537 SHOOT MERISTEMLESS (STM) 279, 280, 284, 285, 287 shox 584 Sry 430, 431 SUPERMAN 299 Tbx 450, 459, 462-464, 634, 639 tinman 507 Trithorax (famille) 93 Tsix 439, 440 WOX2/8 279 Xist 439, 440 XO lethal (xol-1) 435, 436, 440 cités avec produits abdominal A (abd-A) 92, 632, 636, 637 Abdominal B (abd-B) 92, 632 AGAMOUS (AG) 297-299, 301 alx1 262 APETALA 296-299 apterous 481, 486 bcl-2 238, 559 bicoïd 46-49, 54, 58, 59, 66-68 brachyury 11, 162-164, 168, 177, 386, 387 branchless 501, 504 breathless 501, 504 bride-of-sevenless (boss) 497 brinker 479, 480 buttonhead 94 caudal 50, 53, 61 churchill 201 CONSTANS (CO) 301, 302 daf-2 614 decapentaplegic (dpp) 63-66, 461, 479, 480, 483-485, 530, 639 Distal-less (Dll) 484-487, 636, 637 dorsal 52-54, 61-64 doublesex (dsx) 433-435 egl-5 247, 248 empty spiracles 94

Endo-16 262, 263, 315 engrailed (en) 73, 77-82, 87, 90, 401, 465, 484, 485 ets1/2 262 even-skipped (eve) 72-75, 78, 315 FLOWERING LOCUS C (FLC) 302 FLOWERING LOCUS D (FD) 301 FLOWERING LOCUS T (FT) 301, 302 fushi tarazu (ftz) 72, 73, 75, 78, 80 giant 66, 68, 71, 73, 74 Gli 462, 467, 470, 472 goosecoïd 163, 164, 168, 264 gpa16 244 Gremlin 466 gurken 56-58, 60, 61 hedgehog 79-85, 89, 90, 147, 479, 480, 484, 485 hesC 262 hunchback 50, 51, 53, 66-68, 71-74 igf1 582, 584, 615 igf2 422, 610 igfr 423 knirps 66, 68, 71, 74 KNOTTED-1 287 Krox20 526, 527 Krüppel 66, 68, 73, 74, 76 LEAFY (LFY) 296, 299, 301, 302 let-23 251, 252 Lgr5 337 lin-3 251, 252 lin-4 et 14 248, 249 lin-39 247, 248, 250 Lmx1 465, 481, 549 Lunatic fringe 211, 212 MeCP2 558 Meis (famille) 456, 606, 611, 612 Mesp2 220, 221 mrf4 323 msx1 325, 508, 509, 601, 607 myf5 323, 324 myoD 311, 318, 322-324, 346 myogenin 323, 324 myostatin 580 nanog 190, 191, 414 nanos 46, 49-51, 53, 54, 59 neurogenin 538, 539 Nkx2.5 507 No tail (Ntl) 177 nodal 228, 261, 263 Noggin 166, 168-171, 173 omb 479, 480 orthodenticle 94, 528, 638 Otx(2) 523, 524, 528, 638 patched 28, 79, 80, 82, 84, 466, 467 Pax 215, 221, 222, 338, 627 pgl-1 411 pie-1 411, 412 pipe 52 PISTILLA 297-299 PLETHORA 293 pmar1 259, 262

prod1 604-606, 611 prx1 650 retinoblastoma (RB) 324, 577, 600 rhomboïd 62, 63, 83, 485, 534 SEPALLATA (SEP) 299 sevenless 497 Sex combs reduced 93 SHANK3 558 short gastrulation (sog), 65, 66 siamois 152, 153, 176 single-minded 62 skn-1 245 slug 378, 397 snail 62, 63, 377, 378, 381, 397 Sox9 432, 607 spalt (sal) 479, 480 Sprouty 500, 501 string 573, 574 Sex-lethal (Sxl) 434, 440 tailless 66, 68 Tbx4/5 450 TBX5 459 toll 51-53 tolloïd 62, 65 topless-1 279 torso 46, 50, 51, 59 transformer (tra) 433-435 tribbles 574 trunk 51 twist 62, 63, 381 Ultrabithorax (Ubx) 92-94, 487, 488, 632, 636-638 UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) 299 vestigial 478, 481-483 wingless 79-85, 89, 90, 147, 481-485 Xnr 152, 157, 158, 160-162, 166, 168, 169 wunen 416 zerknüllt (zen) 63, 64 contrôle du développement 13, 14, 17-21 gap expression 66-68, 70, 72-75 céphaliques 94 homéotiques 90-95 complexe Antennapedia 91, 93, 95, 215, 632 complexe bithorax 91-95, 215 rôle dans le développement floral 296-299 (voir aussi gènes Hox) homologues 11 Hox 91-95, 215, 317, 625, 626 appendices des arthropodes 634-638 arcs branchiaux 225 Caenorhabditis 247, 248 changements évolutifs 630-638 colinéarité 217, 631 développement des membres 449, 450, 468-473 diversification des plans corporels 632-634 drosophile 91-95, 215, 486, 487, 632 duplication génique 630-632 gènes cibles 633-638

identité somitique 213, 214, 216-218 modifications expérimentales d'expression 218, 219 ordre d'expression 93, 94, 214, 220 patron axial 213-219 poisson-zèbre 214, 631, 640, 641 poulet 217, 218 souris 214-220, 317, 641 système nerveux 527, 528, 532, 533 (voir aussi gènes à homéoboîte ; gènes homéotiques) identification des gènes 11, 12 identité de l'organe floral 297 pair-rule (expression) 71-77 paralogues 215 proneuraux 534, 535 rapporteur 20 régulateur maître 311, 494, 495 soumis à empreinte 420-432 suppresseur de tumeur 577, 578 X-liés 435-440 zygotiques drosophile 46, 47, 61-71 xénope 158, 159 souris 192 génétique classique 13, 132 inverse 13, 135 génome 10, 627 Caenorhabditis 239 génotype 9 GFP (protéine fluorescente verte) 20, 48, 129, 130, 135, 334, 381, 397, 601, 602, 607, 644 GH-RH (hormone de libération de l'hormone de croissance ou somatolibérine) 583 gibbérellines 273, 281, 303 globine expression génique 330-332 région de contrôle du locus (RCL) 332 globules polaires 108, 416, 417 glycosylation 18 GM-CSF (facteur stimulateur de colonies de granulocytes-macrophages) 329, 330 GnRH (ou gonadolibérine) 583 gonades 410, 431 granules P 240, 411, 412 Groucho 315 Gryllus bimaculatus 607 Gurdon, John 19, 344 gynégénotes 420-422

Η

haploïdie 6, 416 hématopoïèse 325-330 hémidesmosomes 334, 365 *Hemigeris* 643 hémoglobine 330-332 hermaphrodites 237, 435-438 hétérochromatine 202, 316 hétérochronie 651, 652 mutations hétérochroniques 248, 249 Hippocrate 3 histones 317-319 holoprosencéphalie 28, 493 homéodomaine 215, 631, 637 homéose 92-94 homologie 634, 639 homoncule 3 hormones 320, 581-584 de croissance 581-584 iuvénile (JH) 590 (voir aussi facteurs de croissance) prothoracotrope (PTTH) 589-591 thyroïdiennes 581, 592 Horvitz, Robert 236 hybridation in situ 20, 127 hydre 521, 596, 597 bourgeonnement 596 croissance 596 polarité 597 régénération 595-597 contrôle génétique 597 région de hypostome 596, 597 hypoblaste 115, 188 Hvracotherium 650

ICSI (injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde) 426 identité dentaire 507-510 de position Caenorhabditis 247, 248 feuilles 290 somites 213, 214, 216-218 IGF-1 (facteur de croissance de type insuline-1) 581-583, 584 IGF-2 (facteur de croissance de type insuline-2) 422, 581-583 immigration (ingression) 115, 389 immunoglobulines (superfamille) 365 indice digital 2D:4D 586 induction et signaux inducteurs 8, 24-27 (de) cellules productrices d'insuline 352-354 compétence 25, 26 développement de la vulve (Caenorhabditis) 250-253 mésodermique 157, 158 poisson-zèbre 176, 177 poulet 196-198 rôle de nodal-related 160, 161 souris 197, 198 xénope 154-164 neurale poisson-zèbre 178 poulet et souris 200-203 xénope 169-173 oursin 259, 260

permissive/instructive 24 réponse aux signaux 26, 27 information de position 27, 29, 30 poils absorbants racinaires 294 développement cérébral 524 membres des vertébrés 454, 459, 461, 467-470 disgues imaginaux 485-488 gradients morphogénétiques 458, 459, 461 rôle de Shh (membre de vertébrés) 461, 462, 465-467, 470 (voir aussi axes corporels; intercalation; identité de position) inhibition latérale 30, 31 poils absorbants racinaires 294 développement neural 535, 538, 539 œil composé 496 insectes appendices pairs 634, 636-638 croissance larvaire 589-592 métamorphose 588-590 mécanisme de mise en place d'une architecture corporelle 75-77 œil composé 87, 489, 490, 494-497 polarité planaire cellulaire 87-89 régénération de patte 595, 607-609 (voir aussi drosophile) intégrines 365 interactions cellule-cellule 8, 14 Caenorhabditis 242-246 spécification des destinées cellulaire 244-246 développement vulvaire 250-253 signalisation cellule-cellule 17 développement des cellules germinales 413, 414 intercalation 382, 383 circonférentielle 605, 609 médio-latérale 385 proximo-distale 604, 607-609 radiaire 385, 386 invagination drosophile 380, 381 évolution de la gastrulation 629 oursin 379, 380 invalidation génique (gene knock-out) 13, 119, 135, 138, 139 système Cre/loxP 137, 138 gènes Hox 218, 219, 225 involution 109, 383, 386 IRM (imagerie par résonnance magnétique) 129 isthme 523

J

Johannsen, Wilhelm 8 jonctions adhérentes 363, 365, 366, 374 dynamique d'adhérence 367-369 gap (ou communicantes) 25, 367 mésencéphale/rhombencéphale (JMR) 523, 524 neuro-musculaires 554-556 formation 557 septées 374, 375 serrées 365, 374-376 Jun N-terminal kinase (JNK) 401

Κ

kératinocyte 332-334 kératine 333 kinase dépendante des cyclines (voir Cdk) kiwi 650, 651 knockdown (voir extinction génique) knock-out (voir invalidation génique)

L

laminine 556 larve 651, 652 Caenorhabditis 237, 239, 248 croissance (vitesse et durée) 589-592 drosophile 41 oursin 254, 255, 259, 261 lépidoptères (voir papillon) leucocytes 327 Lewis, Edward 42, 91 LIF (facteur inhibiteur de leucémie) 340, 341, 350 ligands 27 lignage cellulaire Caenorhabditis 239, 240, 248, 249 restriction clonale 77, 78, 83 développement rhombencéphalique 525-528 traçage 129-131 ligne primitive 113-114, 186 formation 389, 390 espèce humaine 125 poulet 115, 116, 186-189, 195-198, 389-391 souris 122, 195-198, 389, 391 longévité 613, 614 lymphocytes 327

Μ

M-CSF (facteur stimulateur de colonies de macrophages) 329, 330 macrophages 602 maïs 287-289, 303 Malpighi, Marcello 3 mammifères apoptose 238 clonage 345 compensation de dose 438-440 croissance 583 détermination du sexe 430-433 oreille moyenne 648 régénération cardiague 612 extrémités digitales 607 systèmes visuels 551

(voir aussi espèce humaine ; souris) Manduca sexta 589-591 Mangold, Hilde 8 manipulation microchirurgicale adéquation aux embryons de vertébrés 131 poulet 130-132 souris 131, 132 xénope 129-132 MAPK (protéine kinase activée par les mitogènes) 165, 172, 341 masse cellulaire interne (souris) 188-190 maxillipodes 636 mécanisme de réaction-diffusion 194, 471, 472, 500 médecine régénérative 2, 343 cellules souches 348-352 MEF2 (voir facteurs de transcription) méiose 6, 410, 416-419, 436, 437 membrane de fécondation 427 vitelline drosophile 51 oursin 427 xénope 107 membres développement de la patte d'insecte 476, 477, 483-485, 487, 637 évolution 33, 639-643 régénération 29, 594, 611 amphibiens 595, 597-607, 612 insectes 595, 607-609 (voir aussi développement des membres de vertébrés) Mendel, Gregor 6, 8 méristèmes 273, 283-295 apical racinaire 283, 292-294 caulinaires (apical, latéral) 283, 284, 287-290, 292 transition vers un méristème floral 300-302 cellules souches 284-285 devenir cellulaire 285-288 floral 283, 295, 296, 298, 300-302, 304 inflorescentiel 295, 301, 304 mésectoderme (drosophile) 62 mésencéphale (ou cerveau moyen) 522 (voir aussi développement cérébral) mésenchyme 115 primaire 254, 256, 257, 377-379 secondaire 255, 378 transition épithélio-mésenchymateuse (TME) (voir transition) mésenchymato-épithéliale (TME) 208, 209, 367, 369, 502 mésoderme 5, 15, 152 Caenorhabditis 245 drosophile 40, 44, 62, 63 invagination 380, 381 induction (voir induction mésodermique)

mise en place de l'organisation mésodermique 159-164, 166, 167 seuils de réponse (à des signaux) 162-164 structuration du système nerveux 172, 173 vertébrés 104, 112, 113 cœur 505 mésoderme des lames latérales 109, 117, 505 mésoderme intermédiaire 109, 117 mésoderme para-axial 173, 197 mésoderme pré-chordal 116 mésoderme pré-somitique 208-213 poisson-zèbre 176, 177 poulet 115, 117, 118, 195-198 souris 197, 198 xénope 152-164, 386 mésonéphros 431, 432, 436 métamorphose 570, 588, 589, 594, 651-653 contrôle 589-593 drosophile 41, 42, 477, 484 métastases 378 métazoaires 625, 626 origine 626-628 METRO (région organisatrice de transport de messages) 146 microARN 18, 244, 248-250, 290, 422 Bantam 576 microfilaments (d'actine) 368 microtubules 368 réorganisation ovocytaire (drosophile) 58-60 migration cellulaire 362, 397 cellules des crêtes neurales 223-225, 397-399 cellules germinales 414-416 fermeture dorsale (drosophile) 400, 401 fermeture ventrale (Caenorhabditis) 401 gastrulation (oursin) 377-380 primordium de la ligne latérale 399, 400 tangentielle 543 mitose 6, 573 (voir aussi cycle cellulaire) motilité cellulaire 362 modèle ABC d'identité des organes floraux 298, 299 moelle osseuse 327 transplantation 352 épinière différenciation cellulaire 528-530 motoneurones 531, 532 patron antéro-postérieur 532, 533 patron dorso-ventral 528-532 poisson-zèbre 178 poulet et souris 203 sous-types neuronaux 530, 531 Monosiga brevicollis 628 Morgan, Thomas Hunt 8, 9

morphallaxie 595 hvdre 596 planaires 599 morphogenèse 14, 16, 361-363 ramifiée 498-501 morphogène(s) 29 développement cérébral 524 gradients 458-461 seuils de concentration 29, 48 morpholino (voir ARN anti-sens) mort cellulaire (voir apoptose, nécrose) morula 119, 374, 375 mosaïque génétique 83, 86 motoneurones 531, 532 guidage axonal 548-549 mort neuronale 557, 559, 560 MPF (facteur promoteur de maturation/de mitose) 428, 429 mucoviscidose (ou fibrose kystique) 126 mue 589, 594 muscle 322-325, 473, 474 croissance 580, 587 expression génique (xénope) 158 mise en place de l'organisation dans les membres 473 rôle de Pax dans la différenciation 338 mutagenèse criblage 133 poisson-zèbre 133, 134, 177 souris 133 drosophile 43 souris 133 mutant agamus 296, 298 apetala 296, 298 acerebellar 523 pistillata 296, 298 Splotch 222 topless-1 279 mutations à effet maternel 42-44 conditionnelles 12 dominantes 11, 12 hétérochroniques 248, 249 récessives 11, 12 semi-dominantes 11, 12 spécifiques angustifolia 282 bithorax 488 brachyury (semi-dominante, souris) 11, 12 fasciated 300 fass 278, 293 giraffe 220 Haltere mimic 488 iv 227 postbithorax 488 reeler 542, 543 rotundifolia 282 Sasquatch 463 TBX3/5 464 vestigial 11

spontanées 11-13, 132, 133 thermosensibles 12 myoblastes 322, 324, 325, 473 myocarde 504, 609-611 (*voir aussi* cardiomyocytes ; régénération) myotubes 322, 325

Ν

nageoires 639-641 poisson-zèbre 640, 641 Nanog (voir facteurs de transcription) Nasonia 76 nécrose 238 nématodes 236-253 apoptose 238 développement des cellules germinales 411, 412 dilatation dirigée 403 (voir aussi Caenorhabditis) Nematostella 627 néoblastes 599 néoténie 651, 652 nerf optique 551, 552 nétrines 503, 546, 549, 550 neurogénine (voir facteurs de transcription) neurégulines 543 neuroblastes 536-538 neuroectoderme 521, 522, 534 drosophile 44, 62-64, 178 neuroépithélium 534 neurogenèse 339, 533 drosophile 533-539 vertébrés 538-544 neuroligines 557 neurones 520, 521 migration 539-543 motoneurones 531, 532 mort neuronale 557, 559, 560 post-mitotiques 541 rétiniens 490, 550-553 (voir aussi axone ; neurogenèse) neurotrophines 560, 561 neurula 109 neurulation 5, 104, 109, 392, 393 poisson-zèbre 113 poulet 118, 393, 394 primaire/secondaire 393 souris 123 xénope 109, 110, 169-174 NGF (facteur de croissance nerveuse) 560 No-ocelli (voir facteurs de transcription) nœud de Hensen 116 régression 116, 117 transplantation 198, 199, 203 Notophthalmus viridescens 600 nucléase à doigts de zinc 137, 138 nucléosomes 202, 318, 319 Nüsslein-Volhard, Christiane 42

0

obésité 588 Oct4 (voir facteurs de transcription) œil 489, 490 composé 489, 490, 494-497 mise en place 494-497 polarité planaire cellulaire 87 détermination 23 développement (vertébrés) 490-494 absence de développement (Astyanax) 494, 645, 646 rôle du gène Pax6 493, 494, 497, 646, 647 évolution 646, 647 cristallin 645-647 formation 494 placode 490, 491 régénération (triton) 347, 348, 594 (voir aussi rétine) œstrogène 320 œuf 410, 417, 424, 425 Caenorhabditis 240-242 clivage (segmentation) 369, 370 œuf-cylindre 192, 193, 195 drosophile 54-61 évolution 628 phénomènes liés à la fécondation 426-429 activation 427-429 prévention de la polyspermie 426-427 oursin 255, 256, 427 plasme germinal 411 poisson-zèbre 111 poulet 114 taille 419, 652 xénope 145, 146 (voir aussi ovocyte ; ovule ; ovogenèse ; fécondation) oiseaux 113, 114 origine et évolution alaire 642 (voir aussi poulet) ommatidies (voir œil composé) oncogènes 577, 578 Oncopeltus 89 onde calcique 427, 428 ontogenèse 626 oreille moyenne 648 organes génitaux 432, 433 organisateur (centre) gènes exprimés 200 oursin 258, 264 plantes 284, 285, 292 hypostome (hydre) 596-597 (voir aussi nœud de Hensen ; organisateur de Spemann) organisateur de Spemann 8, 17, 24, 25, 108, 150-152 centres équivalents (poulet, souris) 198-200 gènes exprimés 200 induction et organisation mésodermique 159, 160, 162, 163

induction neurale 164-174 protéines produites 168 transplantation 151, 164 organismes modèles 9-11 arbre phylogénétique 10 organogenèse 4, 5, 446, 447 contrôle de la taille des organes 578-580, 587, 588 xénope 111 orientation cellulaire (bourgeon de membre) 452, 453 ossification endochondrale 584, 585 ostéoblastes 584, 585 oursin 254-266 axes corporels 255-256, 260, 261, 263, 264 carte des territoires présomptifs 257, 258 clivage (ou segmentation) 254, 256, 263, 264 contrôle génétique de la squelettogenèse 261-263 cycle vital 255, 652, 653 fécondation 426-428 gastrulation 16, 254, 255, 377-380, 392 larve plutéus 254 œuf 255, 256 polarité axiale 255, 256 cellulaire 373, 374 centres organisateurs 258, 264 régulation de l'expression génique 315 spécification endomésodermique 258, 260, 262, 265 spécification des micromères 262 ovaire 410, 431 oviductes 431, 432 ovocyte 417-420 déclin avec l'âge 419 humain 124 primaire 417 souris 119, 188 xénope 107, 108, 145, 146 ovogenèse 416-419 drosophile 54-61 polarité antéro-postérieure 55-58, 61 polarité dorso-ventrale 60, 61 réorganisation cytosquelettique 58, 59 ovule 111, 119, 424-426 potentialités 420 souris 119 taille 419 xénope 145, 146

Ρ

pancréas 352-354, 578, 579 Panderichthys 639 panda géant 642 papillons (ou lépidoptères) développement alaire 636-638 motifs colorés 485, 486 métamorphose 589, 590

parasegments (drosophile) mise en place 71-77 stabilisation des limites 79-83 parazoaire 625 Parhyale 636, 637 patron d'organisation 14-16 cerveau axe antéro-postérieur 523-524 cortex cérébral 524, 525 développement des membres de vertébrés auto-organisation 471 bourgeon de membre 454-462 muscle 473 rôle de Sonic hedgehog (Shh) 461, 462, 465-467, 470 rôle des gènes Hox 468-471, 473 séparation digitale 475 (voir aussi segmentation/ métamérisation ; drosophile) drosophile aile 481, 483 disques imaginaux 477-486, 488 œil composé 494-497 pattes 483-485, 487 gènes impliqués 180 gènes Hox (somites) 214-219 information de position 27, 29, 30 inhibition latérale 30, 31 mésoderme poisson-zèbre 177 poulet 196-198 seuils de réponse 162-164 souris 197, 198 xénope 159-164, 166, 167 motifs alaires (papillon) 485, 486 plantes feuilles 289-292 fleurs 296-300 racines 292-294 somites 207-222 détermination des devenirs cellulaires 220-222 système nerveux 172, 173 patte de cheval 641-643, 650 Pdx1 (voir facteurs de transcription) peau 332-334 période critique (action d'un tératogène) 458 petit ARN interférent (pARNi ou siRNA) 19, 139 phénotype 8, 9 phocomélie 456, 458 photopériodisme 301 phyllotaxie 289-291 phylogénie 626 pinsons de Darwin 625 Pitx1 et 2 (voir facteurs de transcription) placenta 106 humain 125 souris 120, 121, 188 placozoaires 625, 627, 628

plan corporel 14 araignée 635 arthropodes 634, 635, 637 changements évolutifs 632-634, 649-651 mille-pattes 635 vertébrés 104, 173-175, 633, 634 planaires polarité 598, 599 régénération 595, 598, 599 plaque du plancher 528, 529 du toit 528, 529 neurale 109, 110, 117, 538, 539 modifications morphologiques cellulaires 394 induction 169-172 structuration 172, 173 plasme germinal 411-413 polaire 411 plasmodesme 273, 287 Platynereis 521 Pleurobrachia bachei 627 plutéus (voir oursin) poils absorbants racinaires 294 poisson-zèbre 9, 10, 111-113, 174, 175 asymétrie gauche-droite 227, 228 axe antéro-postérieur 206 axes corporels 175 axe dorso-ventral 206 carte des territoires présomptifs 175, 176 clivage (ou segmentation) 111, 112 cœur 505 régénération 594, 609, 610, 612 cycle vital 111 développement cérébral 523 des cellules germinales 413-415 des nageoires 640-641 embryonnaire 105 criblage de mutagenèse 133, 134, 177 feuillets embryonnaires 175-177 formation des somites 209 gastrulation 112, 113, 386, 388, 392 gènes Hox 214, 215, 631, 641 induction mésodermique 176, 177 ligne latérale 400 transition blastuléenne 175 migration des cellules des crêtes neurales 2.2.4 neurulation 113 transgenèse 135, 138 polarité 14, 15 Caenorhabditis 237, 239-242 cellulaire apico-basale 373 morula (souris) 374, 375 planaire 15, 87-89, 383, 384 développement de membres de vertébrés 457 hvdre 597

oursin (œuf et blastula) 255, 256, 373, 374 planaires 598, 599 (voir aussi axes corporels) pôle abembryonnaire 191 animal 4, 5, 107, 108, 145 embrvonnaire 191 végétatif 4, 5, 107,146 polonaise (mouvements) 390, 391 polydactylie 462, 463, 470 pré-axiale 462, 463 polypose adénomateuse du colon 578 polyspermie (blocage) 426, 427 poulet 114-118 asymétrie gauche/droite 228, 229 axes antéro-postérieur/dorso-ventral 206 corporels 186-188 carte des territoires présomptifs 130, 131, 195, 196 clivage (ou segmentation) 114, 116 cycle vital 115 évolution alaire 642, 643 développement cérébral centres de signalisation 523 rhombencéphale 525-527 développement des cellules germinales 414 développement des membres (voir développement des membres de vertébrés) développement neuronal 548, 549 mort neuronale 557 embryon 3, 9, 10, 105 gastrulation 113, 114, 389-391 gènes Hox 217, 218, 633, 634 induction mésodermique 196-198 neurale 200, 201, 203 lignage (traçage) 130, 131 manipulation microchirurgicale 130-132 migration des cellules des crêtes neurales 397-399 moelle épinière 529, 531, 532 neurulation 117, 118, 393, 394 nœud de Hensen 116, 117, 198-201 œuf 114 somites formation 208-213 organisation somitique 220, 221 structures axiales 203-205 extra-embryonnaires 117, 118, 120 transgenèse techniques 135 transitoire (ou somatique) 139 pouvoir de régulation 7, 8 poulet (blastoderme) 187, 188 souris 189 xénope 154

précurseur d'organe sensoriel (POS) 537 préformation 3 pression hydrostatique 402, 403 primordium 283 feuille 289-291 ligne latérale 399-400 prolifération cellulaire 570, 571 contrôle 572-574 cancer 576-578 sénescence cellulaire 615, 616 promoteur 313 prosencéphale (ou cerveau antérieur) 522 (voir aussi développement cérébral) protéines contrôle génétique 17-19 modifications évolutives 624 post-traductionnelles 18 régulatrices géniques 19, 21 tissus-spécifiques 17 protéines citées APX-1 245 Argos 496 Aux/IAA (voir auxine) Axine 84, 148 Bax 559 Bicoïd 46-50, 66, 67, 74 Blimp1 413, 414 BMP 157, 178 antagonisme 166, 167, 170-173 BMP-2/4 264 BMP-4 64, 66, 166, 171, 638 développement des membres 464-466, 475 développement du système nerveux 529, 530 induction de la plaque neurale 170-172 patron mésodermique 160, 161, 166, 167, 169 patron somitique 222 régénération 599 Cactus 53, 54 cadhérines 56, 365-367, 546 Dachsous (Ds) 575, 608 E-cadhérine 366, 367, 374 Fat 575, 608 N-cadhérine 366 P-cadhérine 366 CAPRICE 294 CED 238 Cerberus 167, 168, 171, 172, 200 Chordin 166-169, 171, 639 interaction avec BMP-4 66, 166 Cyclops 177 Delta 147, 260 développement oculaire 496 développement de la patte 485 rôle dans la neurogenèse 535, 536, 539 Derrière 160, 162 Dickkopf1 151, 169, 172, 173, 200 Dishvelled 148, 151

ENHANCER OF TRYPTYCHON 294 Follistatine 166, 169, 171 Fringe 212 Frizzled 496 Frizzled-related (Frzb) 166, 167 GLP-1 245 Indian hedgehog (Ihh) 584, 585 Izumo 426 Juno 426 LAG-2 437 lefty 177, 192-194, 229, 264 LIM 548, 549 LIN-2 437 MOM-2 et MOM-5 245-247 nAG 602-604 Nodal-related (Ndr, protéine apparentée à Nodal) 152, 162, 177, 178 (voir aussi gènes et produits pour Xnr) Nodal 177, 178, 192-194, 200, 228, 229, 263, 264 Notch développement des membres 485 développement des yeux composés 496 rôle dans la neurogenèse 535, 536, 537, 539 (voir aussi voie de signalisation) PAR 57, 242 PHRP (protéine liée à l'hormone parathyrolde) 584, 585 PIN 278, 279, 291, 293 POP-1 246, 247 Robo 546, 550 SCRAMBLED 294 SDC-2 440 SDF-1 415 SED-1 425 Serrate 147, 228, 481, 485, 496 SEX-1 435 Sex-lethal (Sxl) 433-435 Shh (voir Sonic hedgehog) Short gastrulation (Sog) 65, 166, 638 SHORT-ROOT (SHR) 294 Slit 546, 547, 550 Smad 157, 161, 162, 177 Spätzle 52, 53 Spitz 496, 497 Squint 177 Staufen 58, 59 Survivine 559 SYS-1 246, 247 Toll 51-53 Torpedo 57, 58 Torso 50, 51 Torso-like 51, 54, 59 Trunk 51, 59 **TRYPTYCHON 294** Twisted gastrulation (Tsg) 65 Unpaired 56-58 Vg-1 146, 147, 160, 188 WEREWOLF 294 WRM-1 246, 247

proto-oncogènes 577, 578 protostomiens 254, 627, 639 PTTH (*voir* hormones) PU.1 (*voir* facteurs de transcription) python (*voir* serpents)

R

rachischisis 396 radicaux oxydatifs 615 Rana temporaria 606-607 rate 579 rayons X 459 réaction acrosomique 425, 426 récepteurs CXCR4 415 DCC 549 EGFR 496, 607 Eph 524, 546, 548, 549, 553 ErbB 556 FGFR 485, 500 Frizzled (Fz) 88, 148 Frizzled 7 (Fz7) 150 RAR δ2 606 recombinaison 416 homologue 136, 137 mitotique 83, 86 redondance 32 réflexe rotulien 547 régénération 570, 594-612 cœur mammifères 612 poisson-zèbre 594, 609, 610, 612 cristallin (triton) 347, 348, 594 étoile de mer 594, 595 foie 578-580, 594 hydre 594-597 membres 29, 594, 595, 597-607, 611, 612 amphibiens 597-607, 612 insectes 595, 607-609 rôle de l'innervation (amphibiens) 602, 603 planaires 594, 598, 599 plantes 280 région de contrôle du locus (RCL) 332 rein 580 replis neuraux 109, 110, 393, 394 répresseurs 314 rétine 492, 493 connexions neurales 550-553 raffinement 560, 561 rétrocontrôle (ou boucle rétroactive) négatif 21, 32 positif 21, 318 rhombencéphale (ou cerveau postérieur) 522, 525-527 expression génique (dont Hox) 527, 528 migration des cellules des crêtes neurales 224, 225 rhombomères 224, 225, 525-528 (voir aussi développement cérébral) Roux, Wilhelm 6-8 rubéole 459

S

sauterelle 653 Schleiden, Matthias 4 Schmidtea mediterranea 598 Schwann, Theodor 4 sclérotome (formation) 221, 222 segmentation (métamérisation) 40, 41, 58 expression des gènes de segmentation 77-90 mise en place des parasegments 71-77 spécification de l'identité segmentaire 90-95 stabilisation des frontières parasegmentaires 79-83 sémaphorines 399, 503, 543, 546 sénescence cellulaire 615, 616 influences génétiques 614, 615 serpents des blés et python 633, 634 signal de transduction 25, 26 précoce (oursin) 258, 260 signalisation intracellulaire 25-27 Nodal 178, 192, 193, 198, 229 Wnt 27, 79, 80, 84, 146, 147, 166, 167, 178, 607, 627 cancer 578 croissance de membre 453, 465, 474 développement pulmonaire 500 différenciation cellulaire 315, 339 extension convergente 385, 392 gradient 199, 200 hydre 597 induction mésodermique 161, 169, 197 planaires 599 somitogenèse 222 (voir aussi voie canonique Wnt/βcaténine ; gènes et produits pour wingless) signaux moléculaires intercellulaires drosophile 58 vertébrés 147 sillon morphogénétique 495, 496 situs inversus 227 soies sensorielles (drosophile) 537, somatolibérine (voir GH-RH) somatostatine 583 somites 106 migration des cellules des crêtes neurales 397-399 détermination du devenir cellulaire 219-222 formation 208-213 modèle de l'horloge et du front de détermination 210, 211 identité 213-218 organisation interne 221 poisson-zèbre 113 poulet 116-119, 208-213 souris 122 xénope 173

Sonic hedgehog (Shh) 28, 222, 229, 466, 467 développement des membres 451, 461, 462, 465-467, 470 développement de l'œil 493 absence de développement (Astyanax) 646 développement pulmonaire 500 développement du système nerveux 529-531 souris 9, 10, 105, 119-123 asymétrie gauche-droite 227, 228 axe antéro-postérieur 192, 193, 206 axe dorso-ventral 206 carte des territoires présomptifs 195, 196 cellules souches embryonnaires (ES) 340-342, 350, 352 chimère 24, 136, 137, 189 clivage (ou segmentation) 119, 121, 188 cœur 505 régénération 610-612 compaction 374 criblage de mutagenèse 133 croissance musculaire 587 cycle vital 120 détermination du sexe 430, 436, 437 développement des cellules germinales 413-415 développement cérébral (centres locaux de signalisation) 524 développement des membres 450, 456, 462, 470, 472 développement post-implantation 119-123 épiderme 334 épithélium intestinal 336, 337 formation des somites 208, 209 gastrulation 113, 120-123, 195, 389, 391 gènes Hox 214-219, 317, 633, 634 induction et organisation mésodermique 197, 198 manipulation microchirurgicale 131, 132 neurulation 123 nœud 198-200 ovocyte 188 ovule 119 organisation corporelle 104 somitique 220, 221 polarité (blastomères) 374, 375 régénération des extrémités digitales 607 régulation de l'expression génique 313 retournement de l'embryon 123 spécification cellulaire précoce 189, 190 structures axiales 203-205 extra-embryonnaires 188, 190 techniques de transgenèse 135-139 traçage de lignage 131 spécification 22, 23 cellules germinales 411-414, 423 identité neuronale 522-533

Spemann, Hans 8 spermatogenèse 418, 419 spermatozoïde 424-426 capacitation 424 réaction acrosomique 425, 426 (voir aussi fécondation) spina bifida 396 stigmates 500 stade phylotypique 105, 630 Steptoe, Patrick 126 Strongylocentrotus purpuratus 9, 254 (voir aussi oursin) substance blanche 539 substance grise 539 Sulston, John 236 suppression phénotypique 94 symétrie bilatérale 625, 626 radiaire 625, 626 synapses 520, 521, 554, 555 formation et raffinement 554-562 interactions réciproques 556-558 syncytium 38, 44-46 syndrome d'Angelman 423 de Bardet-Beidl 467 de Beckwith-Wiedemann 423 de Down 419 de Gorlin (nœvomatose basocellulaire) 578 de Holt-Oram 464 de Hutchinson-Gilford (progeria) 615 de Klinefelter 430 de Okihiro 459 de Okihiro/Duane (acro-réno-oculaire) 464 de Werner 615 de Prader-Willi 423 de Rett 558 de Schinzel (cubito-mammaire) 464 de Townes-Brockes 464 de Turner 430, 584 de Turner-Kieser (nail-patella) 465 de l'X fragile 558 main-pied-utérus 470 système nerveux 520-522 navigation axonale 544-554 spécification de l'identité cellulaire 522, 533 drosophile 533-538, 544 vertébrés 538-544 (voir aussi développement cérébral ; neurones ; neurulation ; moelle épinière) système vasculaire 502-504

T

Takifugu rubripes 631 TALENS (nucléases effectrices de type activateur de transcription) 137 TCF (*voir* facteurs de croissance) technique *Minute* 83, 85-87, 574

tectum (ou toit optique) 551-553 télomères 616 tendons 473, 474 tératocarcinome 350 tératogène 28, 458, 459 testicules 410, 431, 432 testostérone 320, 431, 432 têtard disparition du stade 652 métamorphose 592, 593 tête arthropodes 638 céphalisation (vertébrés) 200 drosophile 94, 638 gènes gap céphaliques 94 hydre 596, 597 organisateur céphalique 167 TGF- β (facteur de croissance transformant β) famille du TGF-β 27, 147, 157, 199 induction mésodermique 160, 161 thalidomide 456, 458, 459 théorie cellulaire 4-6 thérapie cellulaire 348-355 thrombine 600 thymus 579 TILLING 134, 135 tissus racinaires 292-294 toit optique (voir tectum) TOR 571, 591 totipotentialité zygote 31 végétaux 273 trachée drosophile 500, 501 médecine régénérative 349 vertébrés 500 traduction 18, 312 transcription 18, 312 contrôle 313-316 transdifférenciation 325, 346-348, 601 remplacement cellulaire 353, 354 Caenorhabditis 347 méduse 347 transfert de noyau (voir transplantation) transformation homéotique 215, 219 transgenèse techniques 20, 119, 135-139 drosophile 69 poisson-zèbre 135, 138 poulet 135 souris 131, 135-139 xénope 135 transitoire (ou somatique) 139 végétaux 280, 281 transition blastuléenne 158, 159 épithélio-mésenchymateuse (TEM) 223, 367-369, 377, 378, 381, 389, 391, 397 mésenchymato-épithéliale (TME) 208, 209, 367, 369, 502

transplantation 130-132, 154 nœud de Hensen 198, 199, 203 organisateur de Spemann 151, 164 région de l'hypostome (hydre) 596, 597 transfert de noyau de cellule somatique 344, 345 transposon 69 Tribolium 76 Trichoplax 627, 628 triploblastiques 15, 625 triton (régénération) cristallin 347, 348 membre 597, 601 tube neural 5, 105, 106, 109, 110, 117, 118, 392-396, 539 malformations 395, 396 formation (voir neurulation) Tulerpeton 639, 640 tyréostimuline (TSH) 592

U

Urbilateria 626

V

vaisseaux lymphatiques 503 sanguins 502-504 vasculogenèse 502, 503 VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) 379, 502-504 VegT (voir facteurs de transcription) rôle dans l'induction mésodermique et plan d'organisation 161, 162 veines 503 vernalisation 301 vésicule(s) de Kupffer 228 optiques 490-493 synaptiques 556 vitelline 118, 119, 125 vieillissement 570, 613-616 sénescence cellulaire 615-616 influences génétiques 614-615 voies de signalisation 58 acide rétinoïque 462 canonique Wnt/β-caténine 80, 81, 84, 148-151, 173, 175, 578 développement de l'hydre 597 (*voir aussi* β-caténine ; signalisation Wnt) Delta-Notch 55, 56, 211, 260, 501 (voir aussi protéine Delta ; protéine Notch) FGF 165 Hedgehog 27, 80, 82, 627 cancer 578 Hippo 190, 483, 574-576, 608 JAK-STAT 56, 57 JNK 401 Nodal 177, 178, 193, 194, 229, 261, 264 Notch 27, 211, 212, 334, 503 Sonic hedgehog (Shh) 462, 466

Toll 54 TOR 571, 591 vrais jumeaux 9 vulve (*voir Caenorhabditis* et développement)

W

Waddington, Conrad 198 Warts (Wts) 574, 575 Weismann, August 5, 6, 8 Wieschaus, Eric 42

Х

xénope 2, 10, 107-111 asymétrie gauche-droite 227, 228 axe antéro-postérieur 206 axes corporels 145-152 axe dorso-ventral 206 carte des territoires présomptifs 129, 130, 153, 154 chorde 387-389 dilatation dirigée 402 clivage (ou segmentation) 14 cœur 505 cycle vital 107 déterminants cytoplasmiques 31 développement des cellules germinales 412-414 embryonnaire 105

fécondation 107, 146, 149, 150, 426, 428 feuillets embryonnaires 152-164 extension-convergente 383, 384, 386-389 induction mésodermique 154-158, 159-164 patron et gènes impliqués 180 formation de la tête 200 somitique 173, 209 gastrulation 108, 109, 153, 165, 167-169, 173, 174, 383, 384, 386-388, 392 manipulation microchirurgicale 129-131 métamorphose 592, 593 migration des cellules des crêtes neurales 398 neurulation 109, 110, 173, 174 organisateur de Spemann 150-152 induction neurale 164-174 induction et organisation mésodermique 159, 160, 162, 163 organogenèse 111 ovocyte 107, 108, 145, 146 régulation 154 stades du développement 4, 5 transfert nucléaire 344, 345 transgenèse technique 135 transitoire 139

transition blastuléenne 158, 159 zone marginale 153, 159

Y

Yamanaka, Shinya 19 Yorkie (Yki) 574-576

Ζ

zona limitans intrathalamica (ZLI) 523, 524 zone d'activité polarisante (ZPA) 451, 456-459, 461, 467, 643 du manteau 539 marginale 153, 159 marginale postérieure 187, 189, 197 pellucide 119, 425 séquence régulatrice de la ZPA (ZRS) 463 sous-ventriculaire 539 ventriculaire 539 zootype 632 zygote 5, 6, 31 Caenorhabditis 242 poisson zèbre 111 souris 119, 188 xénope 107, 108