

Plan du cours « Biologie du développement »

Partie I : Notions de base de la biologie du développement.

Définitions, les principales étapes de l'embryogenèse

Les facteurs moléculaires contrôlant les processus de base : différenciation et communication cellulaire ,morphogenèse

La génétique du développement, l'embryologie expérimentale et les techniques d'analyse de l'expression et de la fonction des gènes.

Partie 2 : Les premiers stades du développement chez le xénope et le zebrafish:

Les premières étapes menant au stade phylotypique

Le Xénope : gènes et facteurs régulateurs importants impliqués durant les premiers stades.

Le zebrafish ou poisson-zèbre : gènes et facteurs régulateurs importants impliqués dans les premiers stades

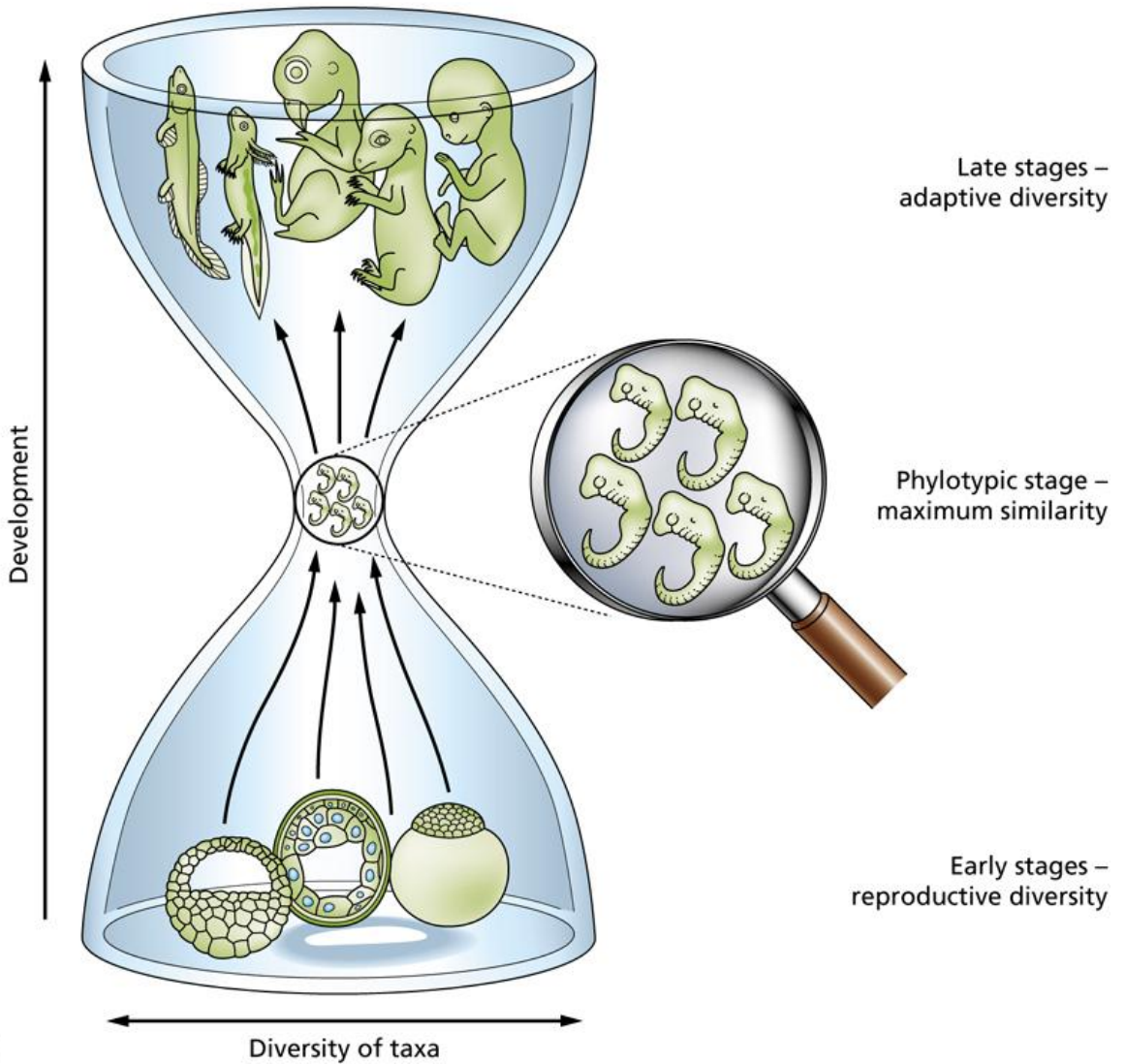
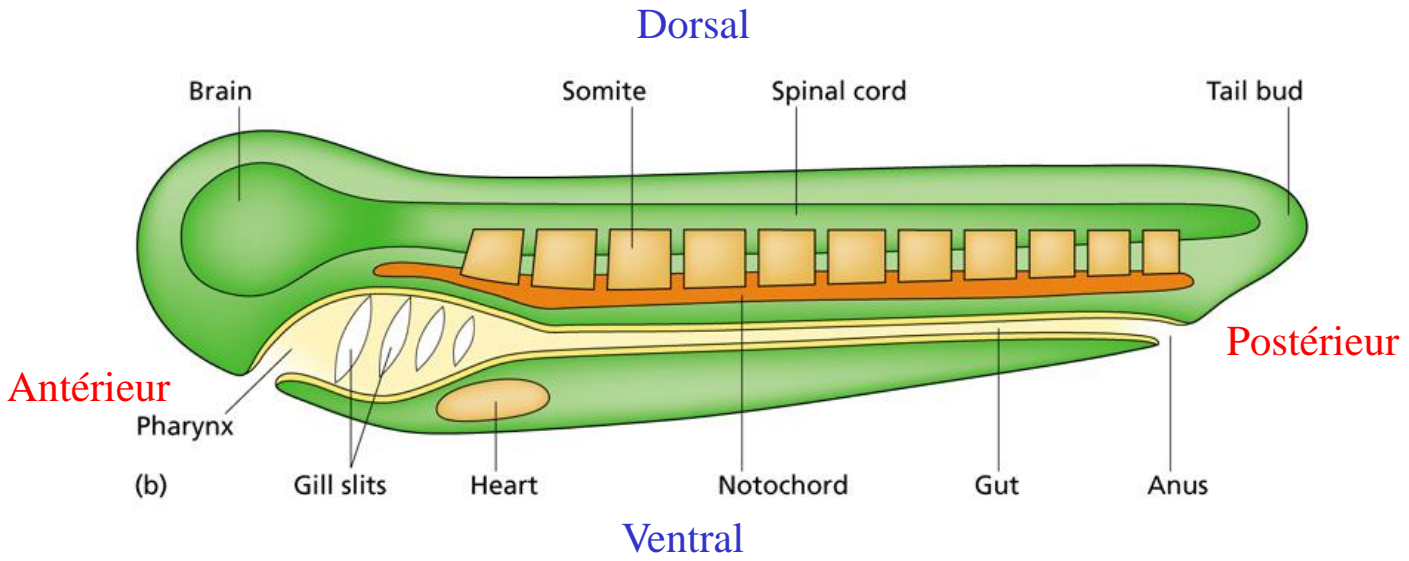
Partie 3 : L'organogenèse

.La formation du système nerveux à partir de l'ectoderme

.Le « remodelage » du mésoderme (somitogenèse, formation des muscles squelettiques, formation des membres, ...)

Formation et remodelage de l'endoderme; développement du pancreas.

Le stade phylotypique : Similarité maximale entre les espèces



Structure générale des embryons à l'état phylotypique :

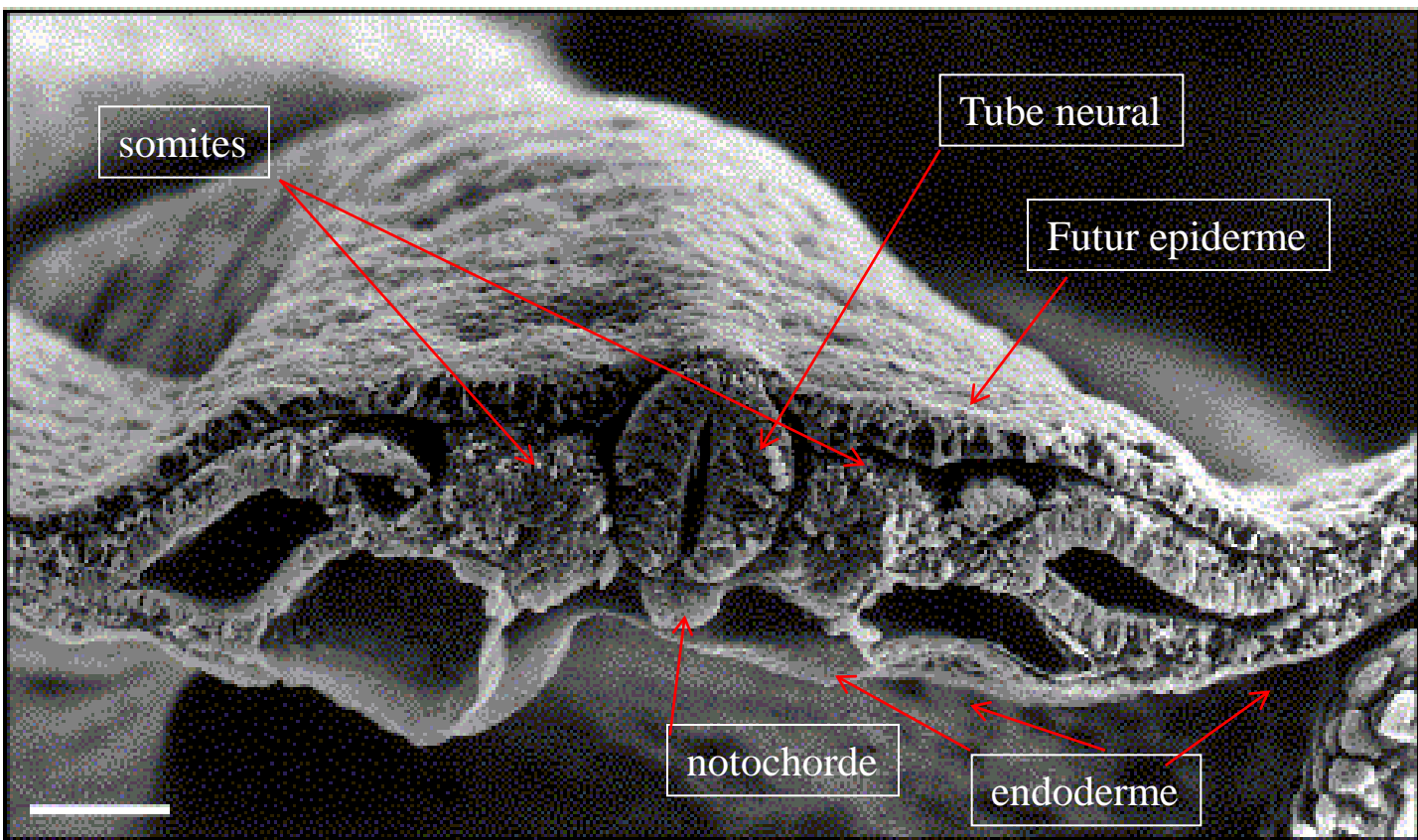
Futur épiderme (⊖épiderme prospectif) : épithélium externe

Tube neural situé sur la ligne médiale de l'embryon

Notochorde située en dessous du tube neural

Somites situées de chaque côté de la notochorde

Endoderme : épithélium situé en dessous de la
notochorde



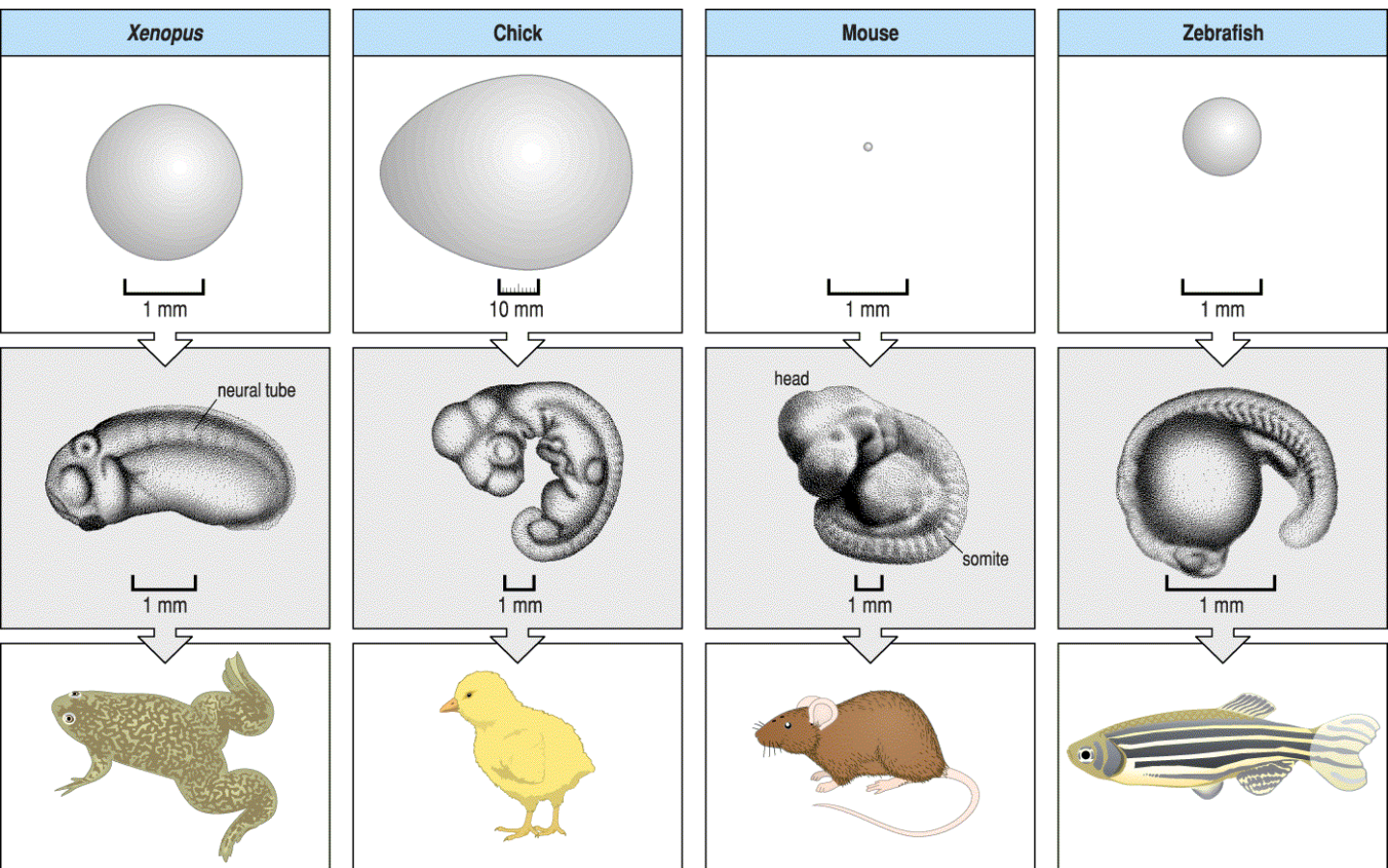
coupe transversal d'un embryon de poulet

Avant l'étape phylotypique : différence de morphologie des embryons

Due à la différence de la quantité de vitellus dans l'œuf :

→ Les premières divisions cellulaires sont différentes:

- peu de vitellus : divisions complètes (holoblastiques)
- beaucoup de vitellus : divisions incomplètes (méroblastiques)



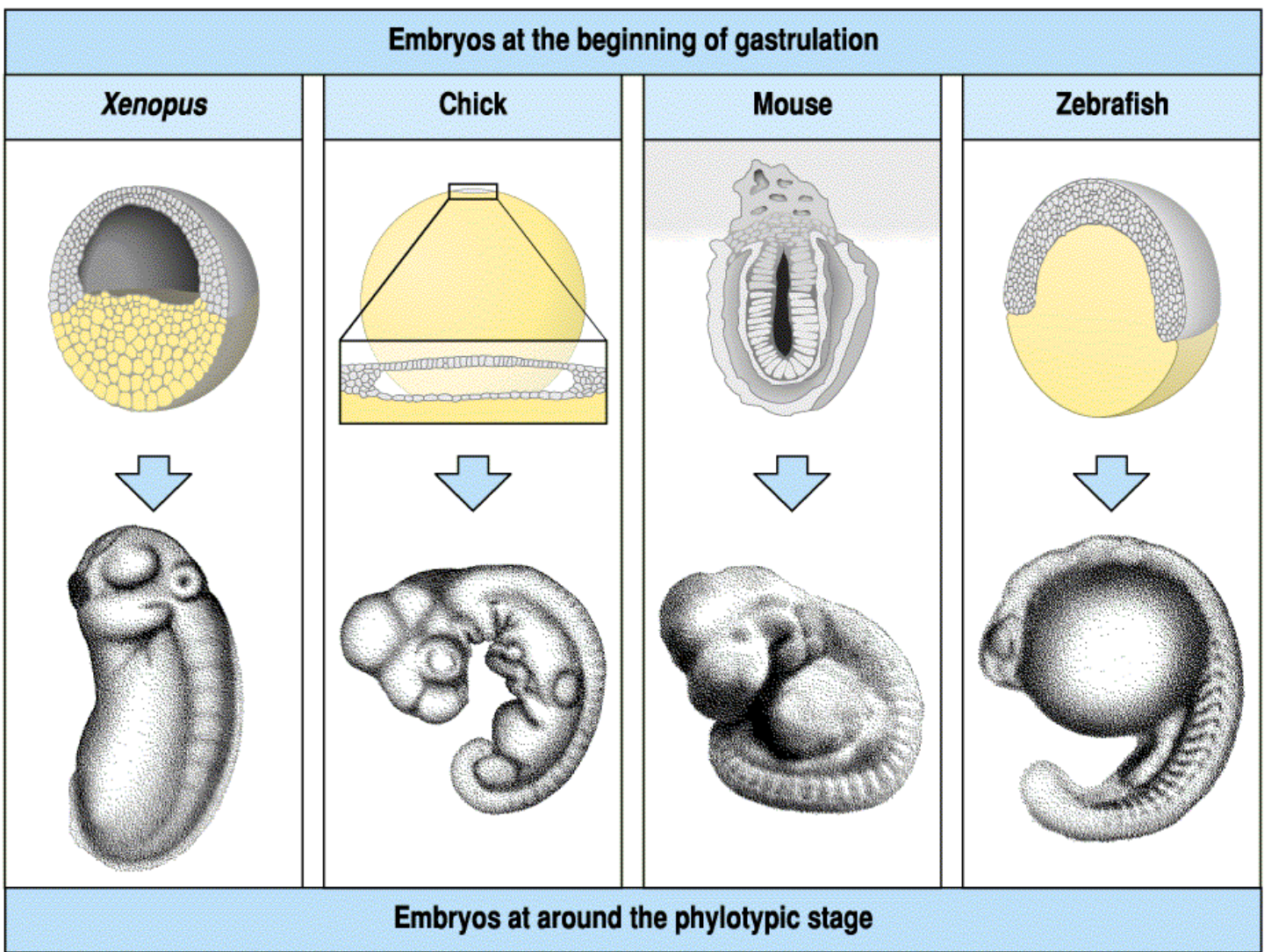
Holoblastique

Méroblastique

Holoblastique

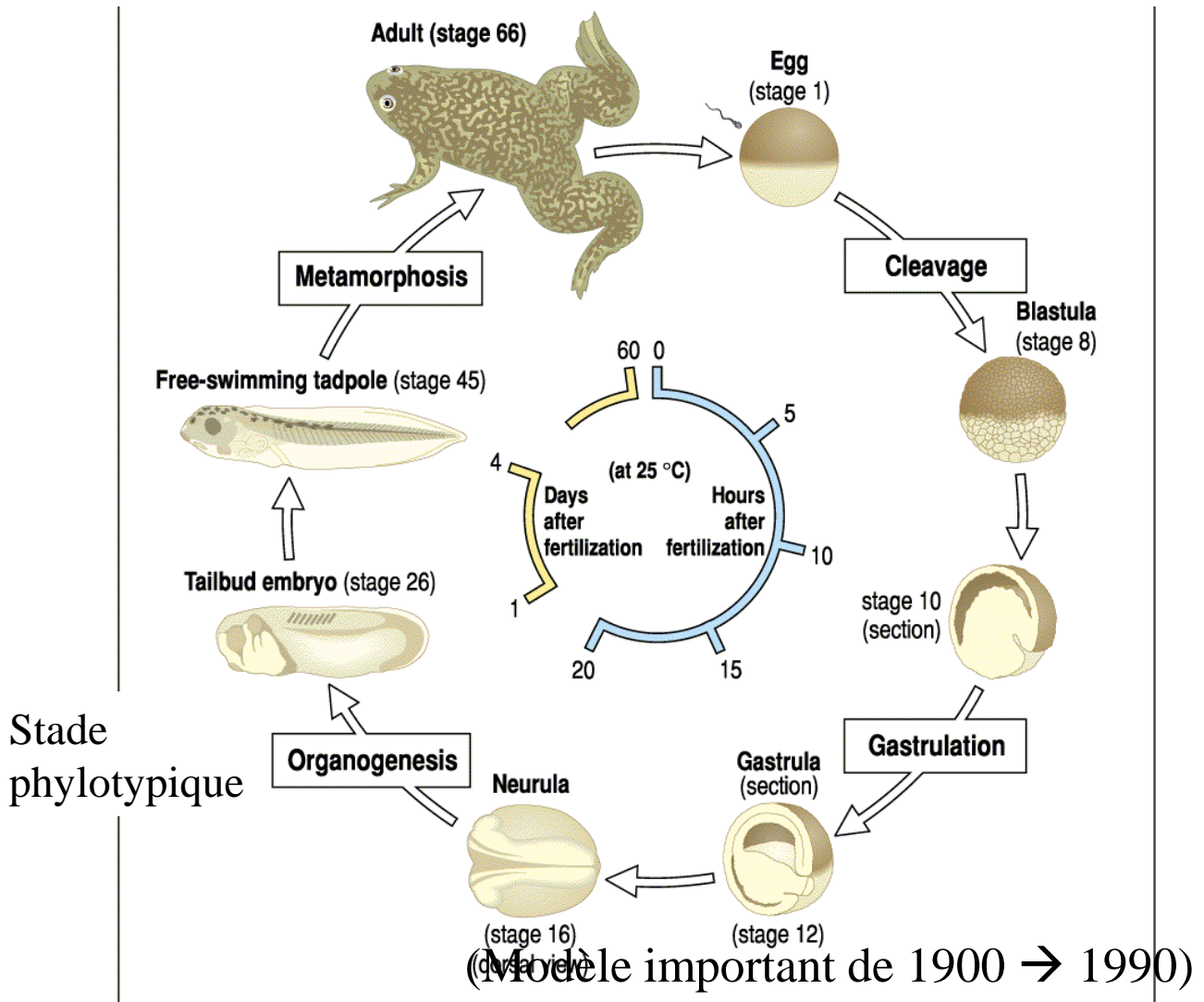
Méroblastique

Différences entre les espèces dans les premiers stades du développement embryonnaire.



→ Pour les mammifères : mise en place des Membranes extra-embryonnaire (placenta)

1) Le xénope (*Xenopus laevis*)



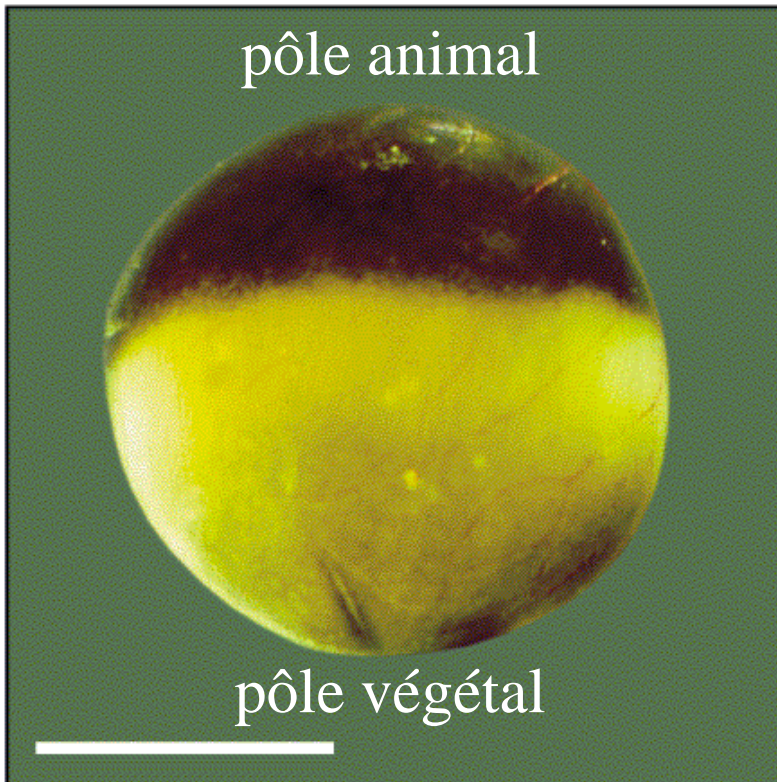
Avantages :

- Nombreux embryons disponibles
- Fécondation et développement externe
 - dépendant de la température (stade num.)
- Micromanipulation aisée (embryologie expérimentale)

Désavantage :

- pas d'approches génétiques (temps de génération > 1an)
(pseudotétraploïde)
- Injection d'ARNm ou de morpholinos antisens.

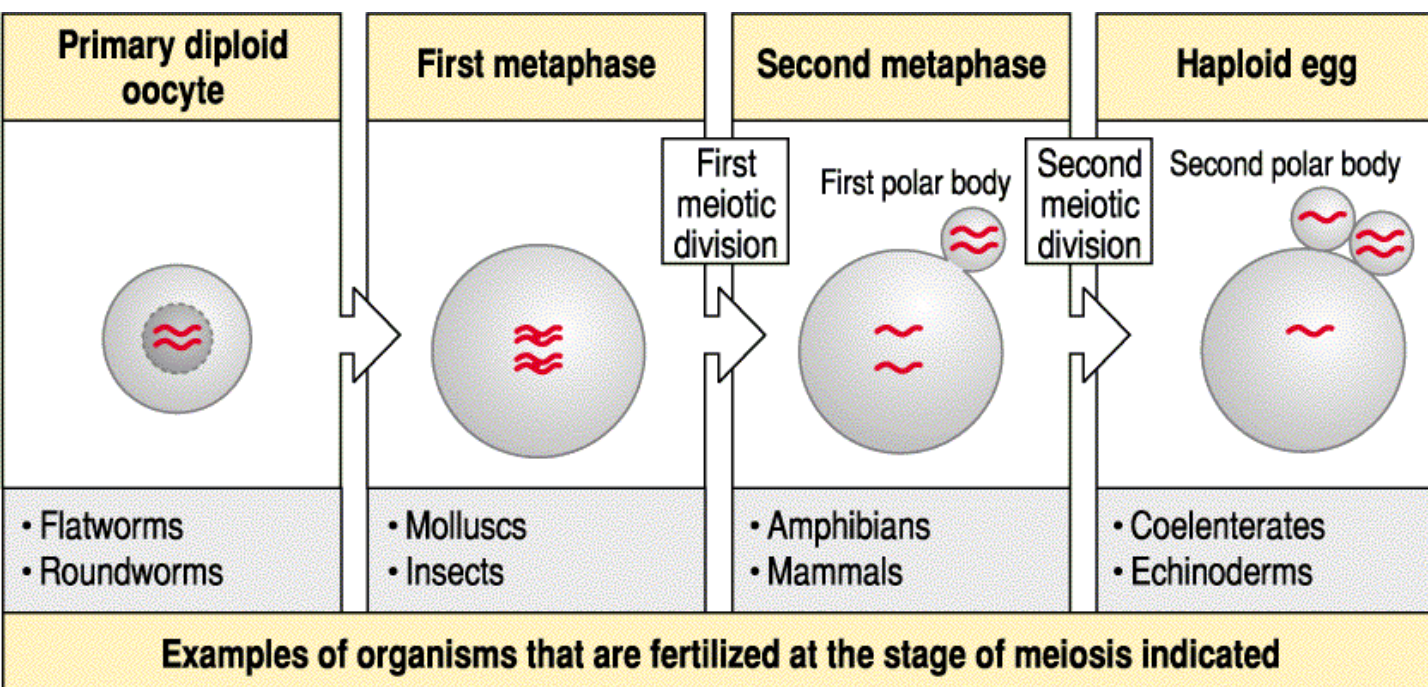
Morphogenèse des premières phases de l'embryogenèse



Œuf non fécondé de Xénope
(+/-1.5mm)

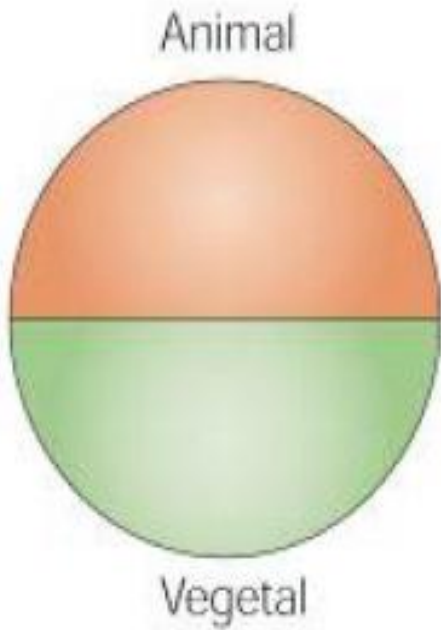
→ symétrie Radiale)

Fécondation → Activation (Ca^{++}) → fin de la meiose, mouvement de rotation corticale et mitoses ...

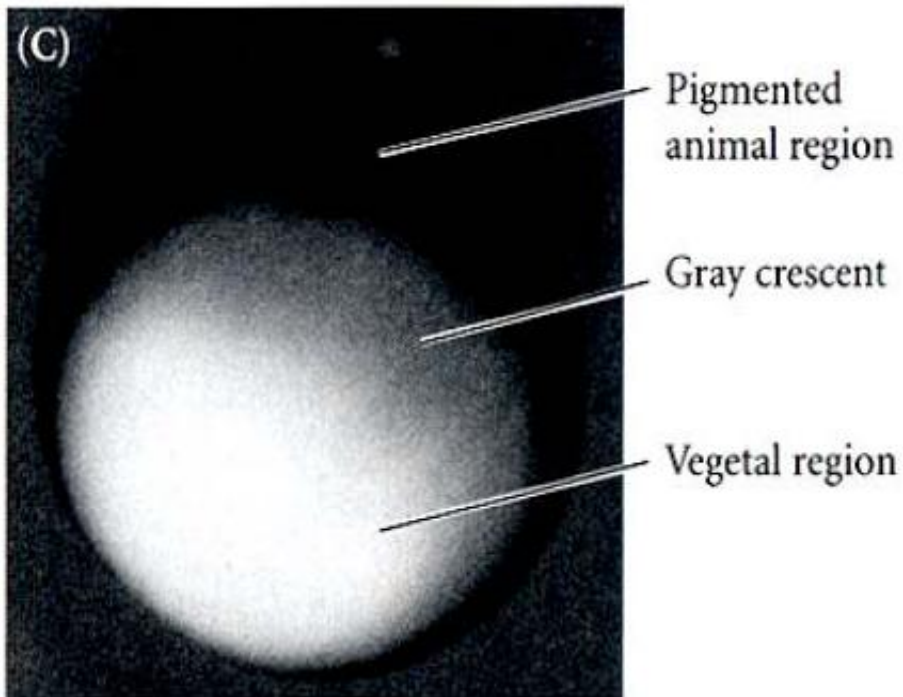
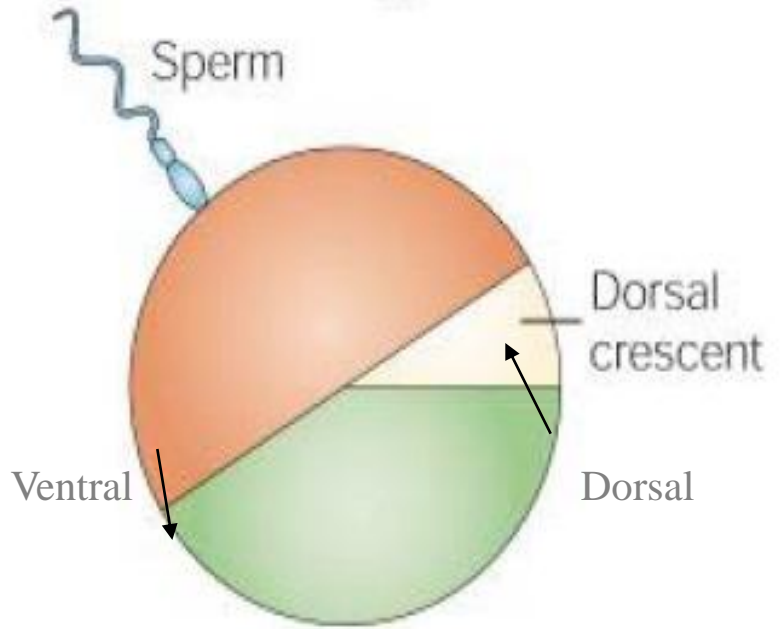


Rotation corticale

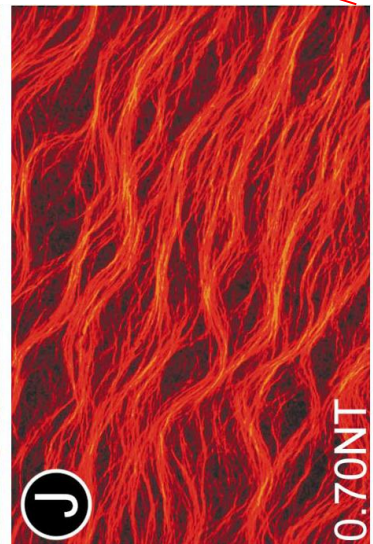
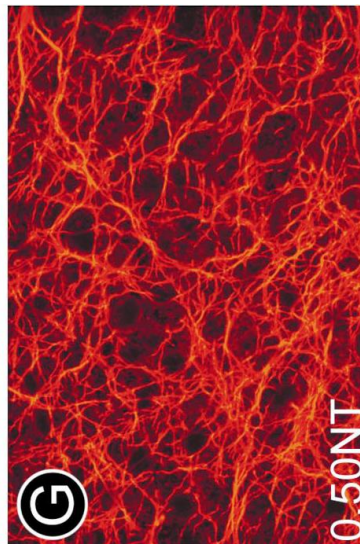
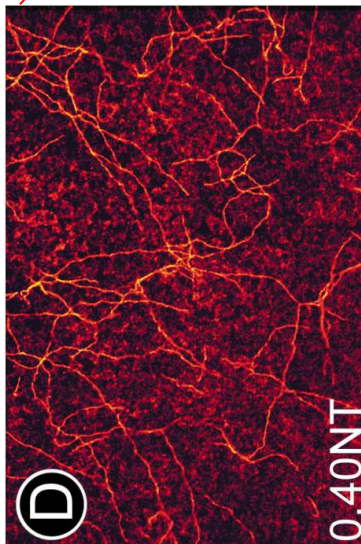
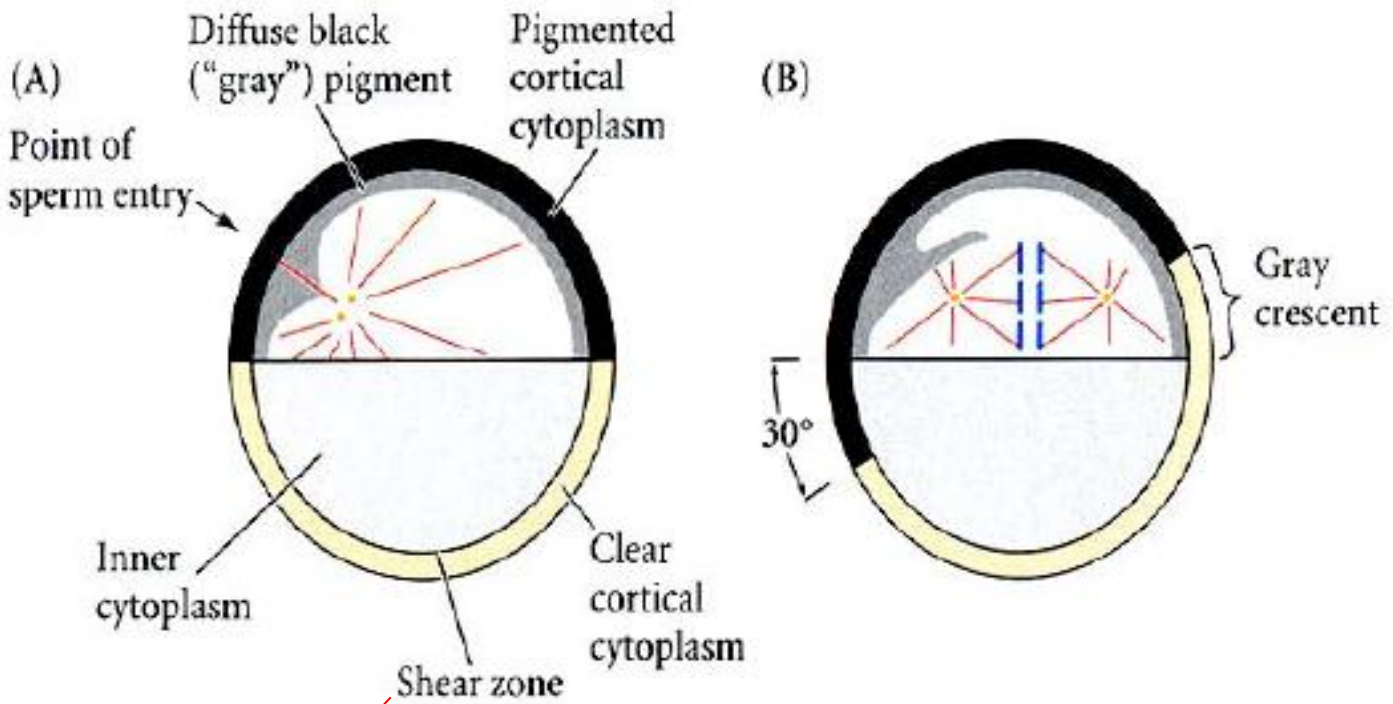
Oocyte



Fertilized egg

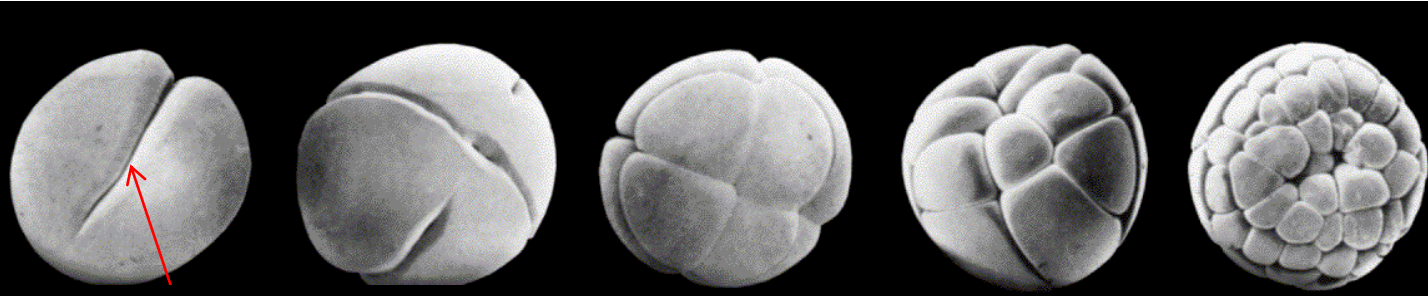


Rotation corticale

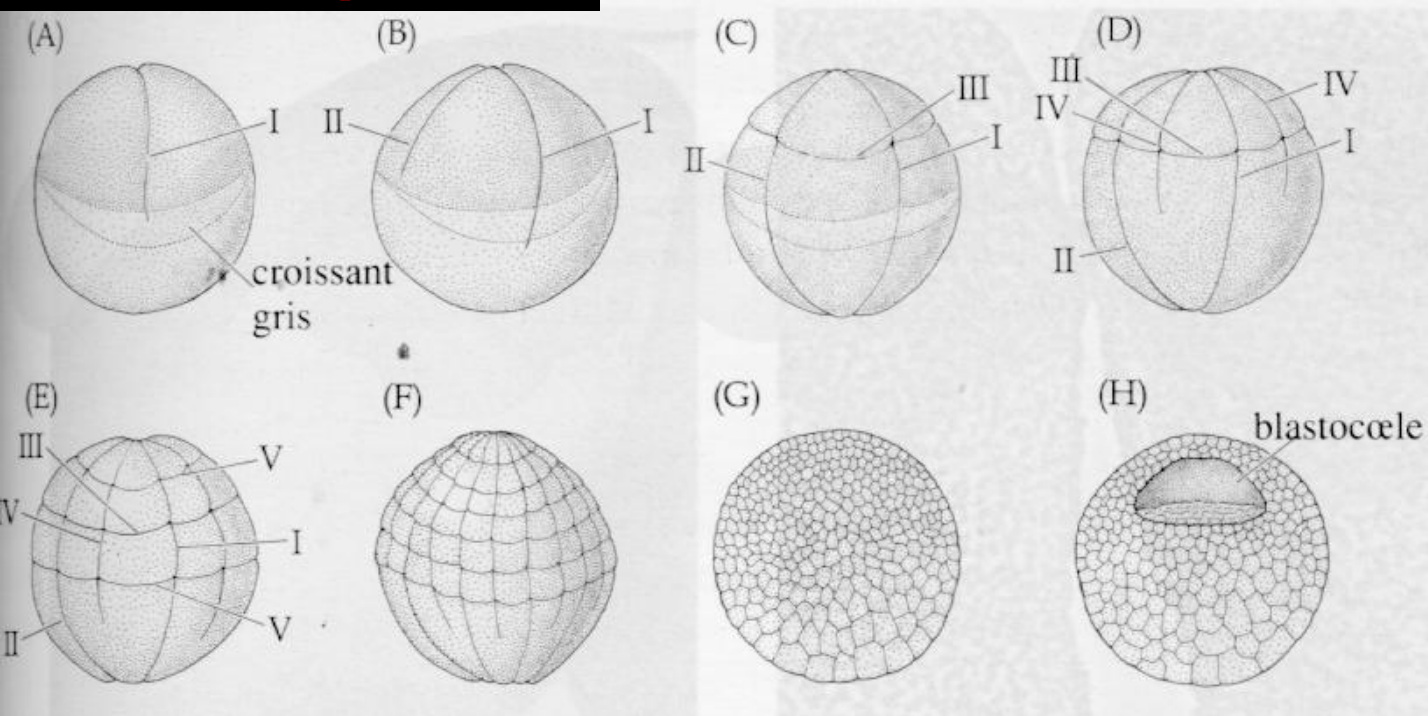


Formation d'un réseau de microtubules parallèles dans la région sous-corticale du pôle végétal durant la rotation.

Le clivage



Point d'entrée du spermatozoïde



Clivage complet du zygote (holoblastique)
mais inégal (due au vitellus)

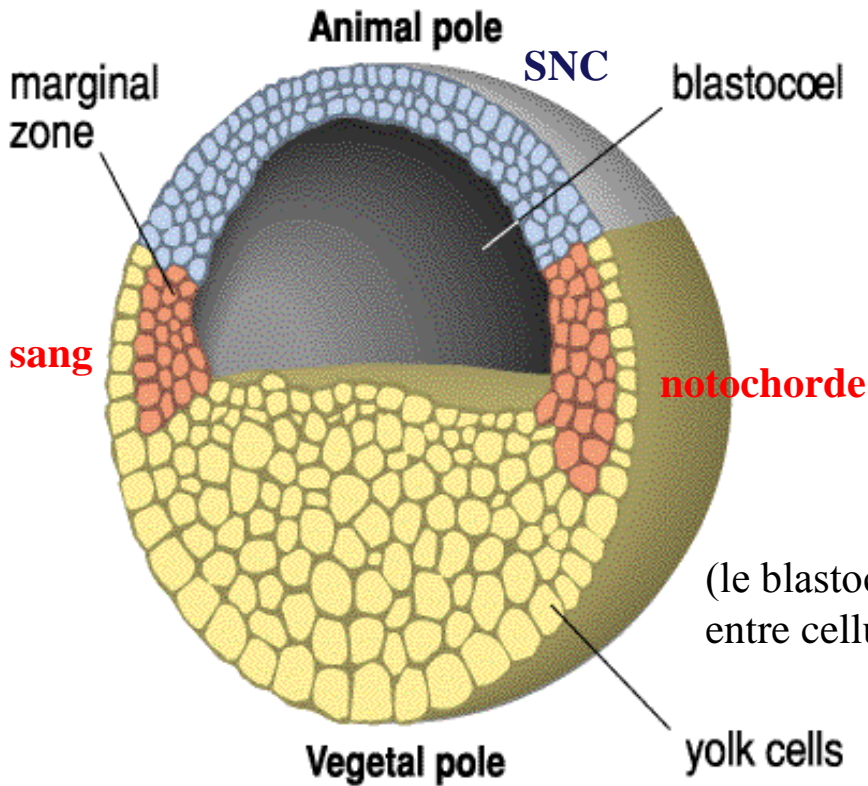
NB: clivage rapide (20 min.), synchrone, radial et sans
croissance.

→ 12 division : Blastula (environ 4000 blastomères) «Mid-
Blastula-Transition » : début **de la transcription des gènes**
et mouvements cellulaires

→ gastrulation

La gastrulation

= internalisation de l'endoderme et du mésoderme
l'ectoderme recouvre tout l'embryon



Carte de destin :

Endoderme

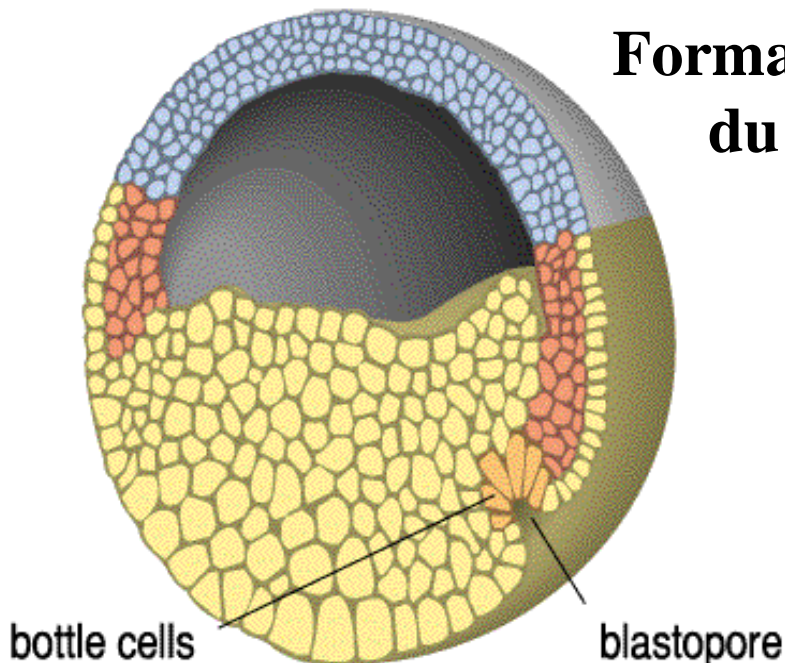
Mésoderme

ectoderme

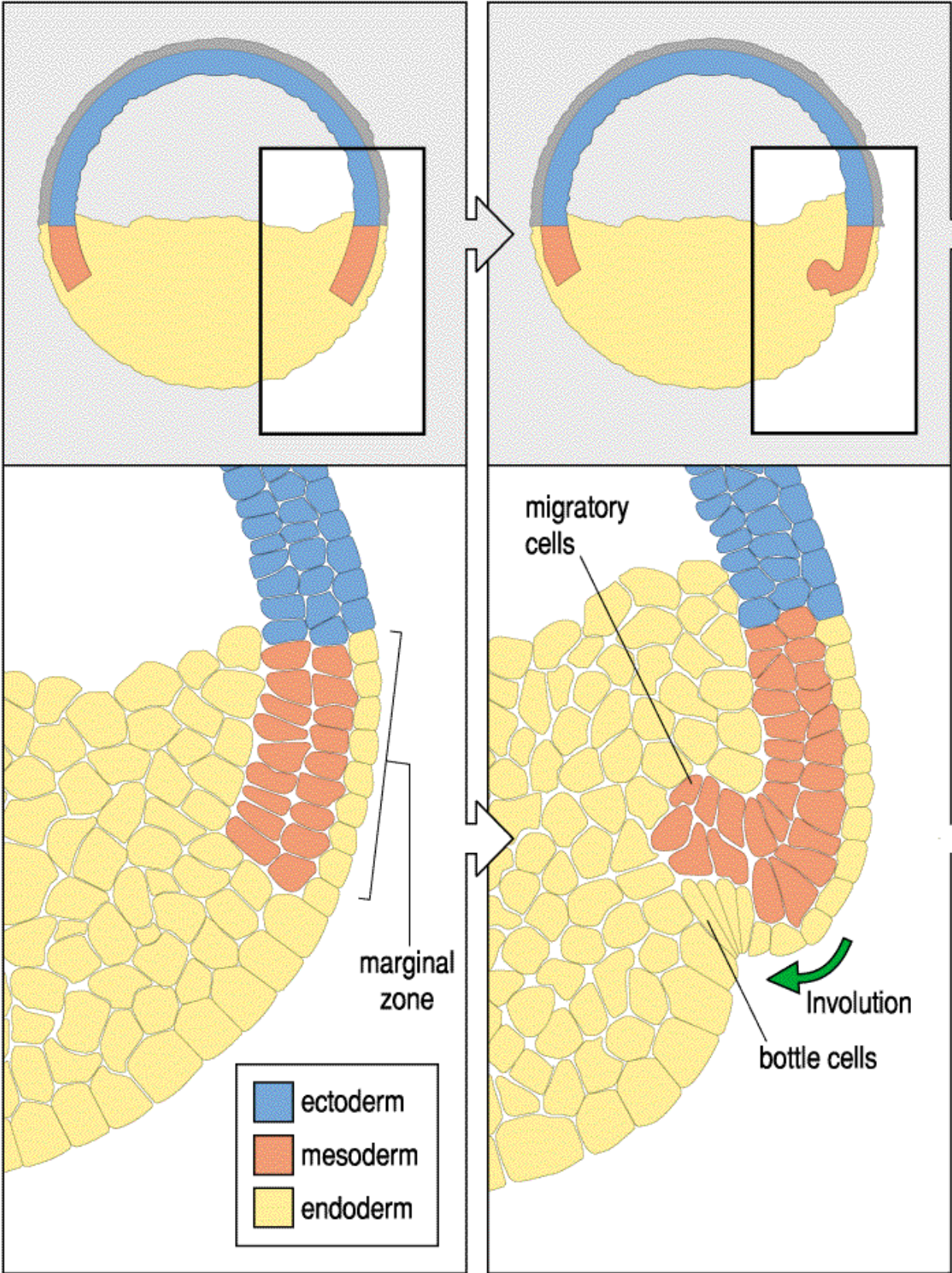
Mouvement d'involution :

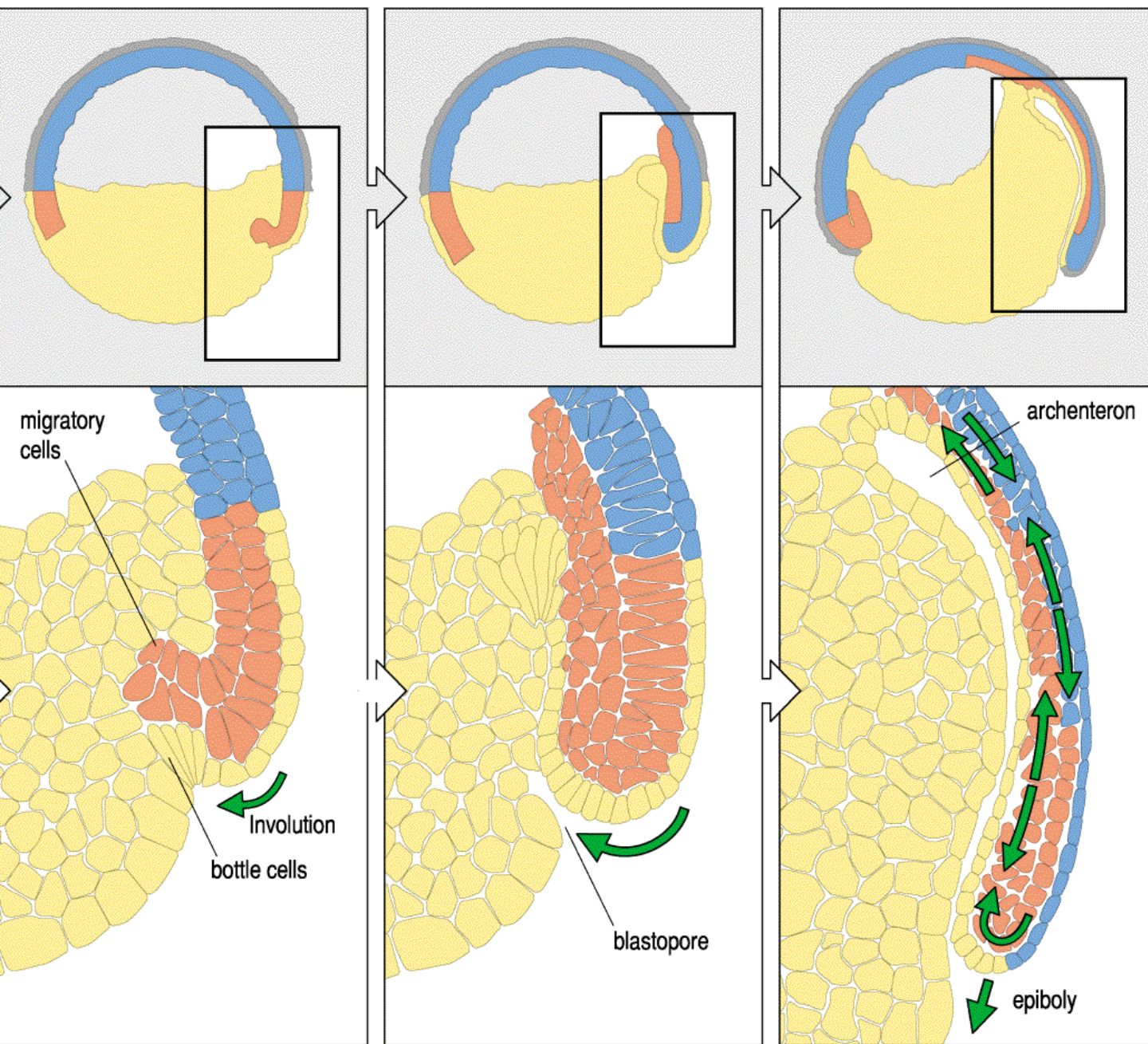
Formation du blastopore

du côté « dorsal »



Le mouvement d'involution





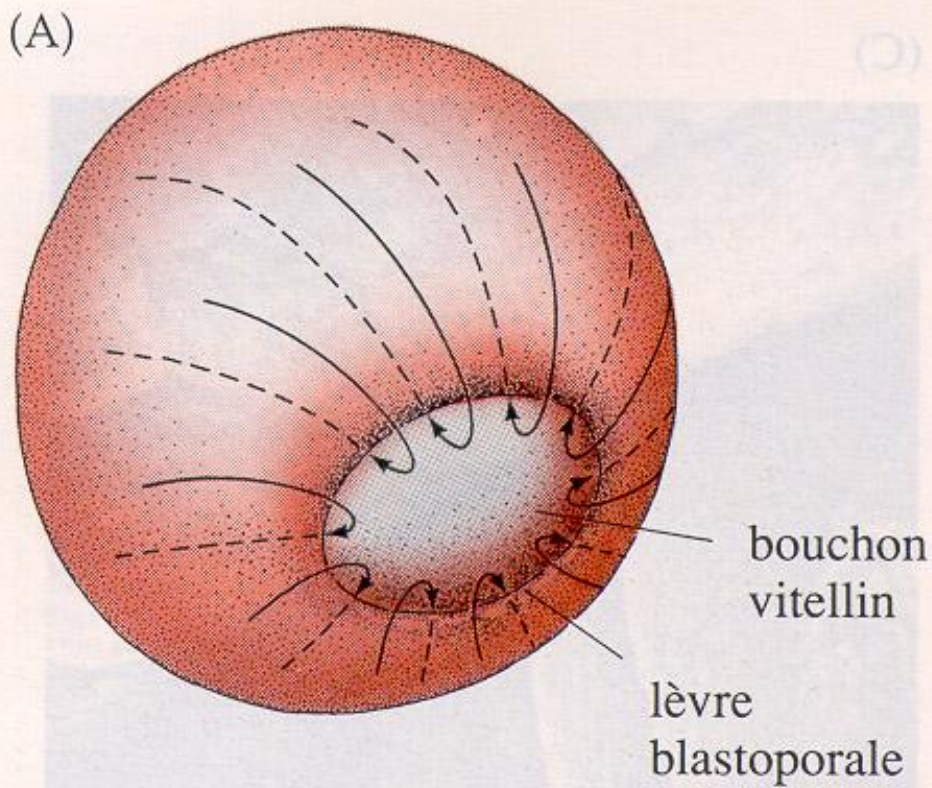
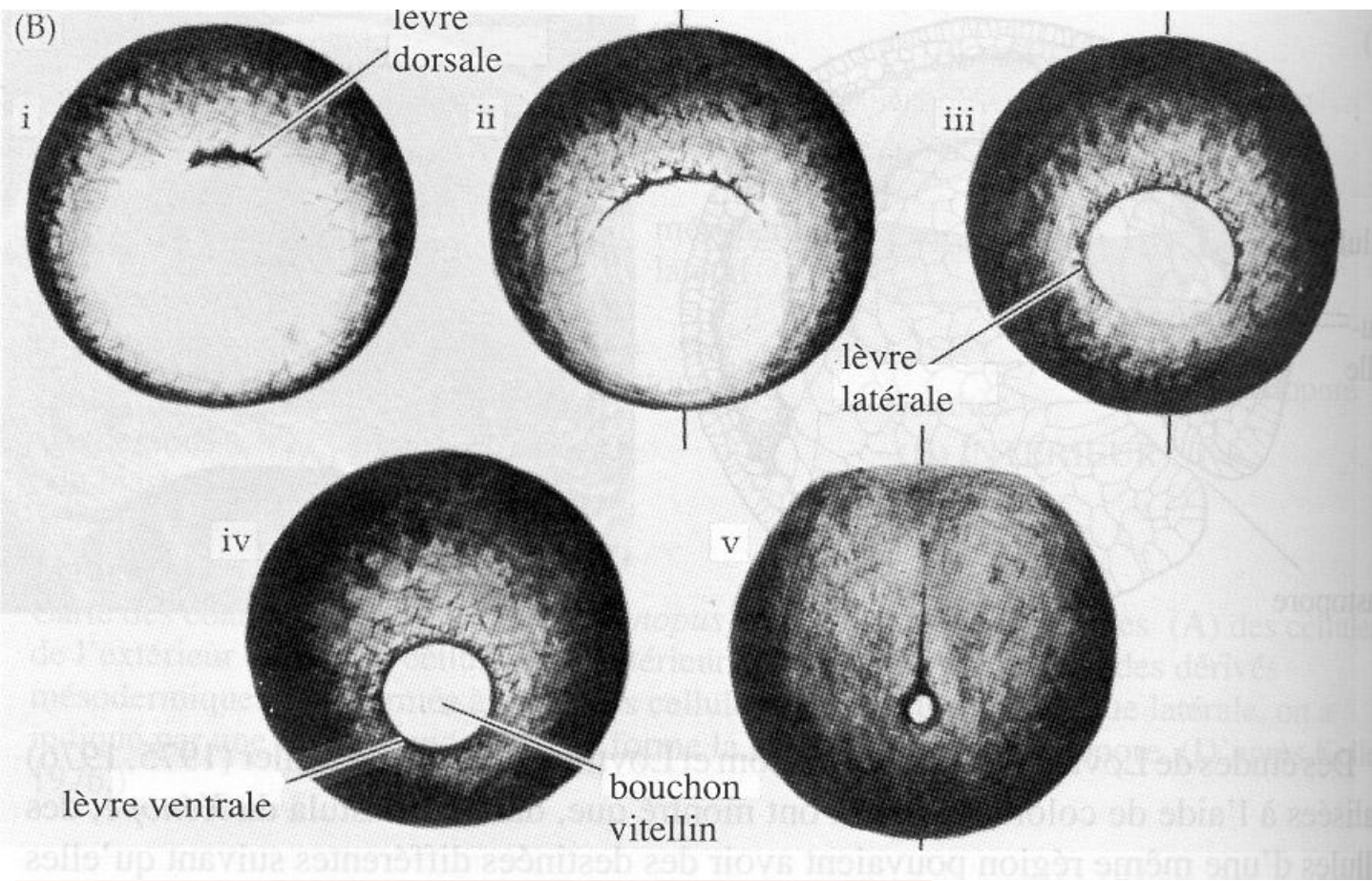
Migration des cellules mésodermiques vers le pôle animal (fibronectine)

→ Formation de l'archentéron (cavité de l'intestin primitif)

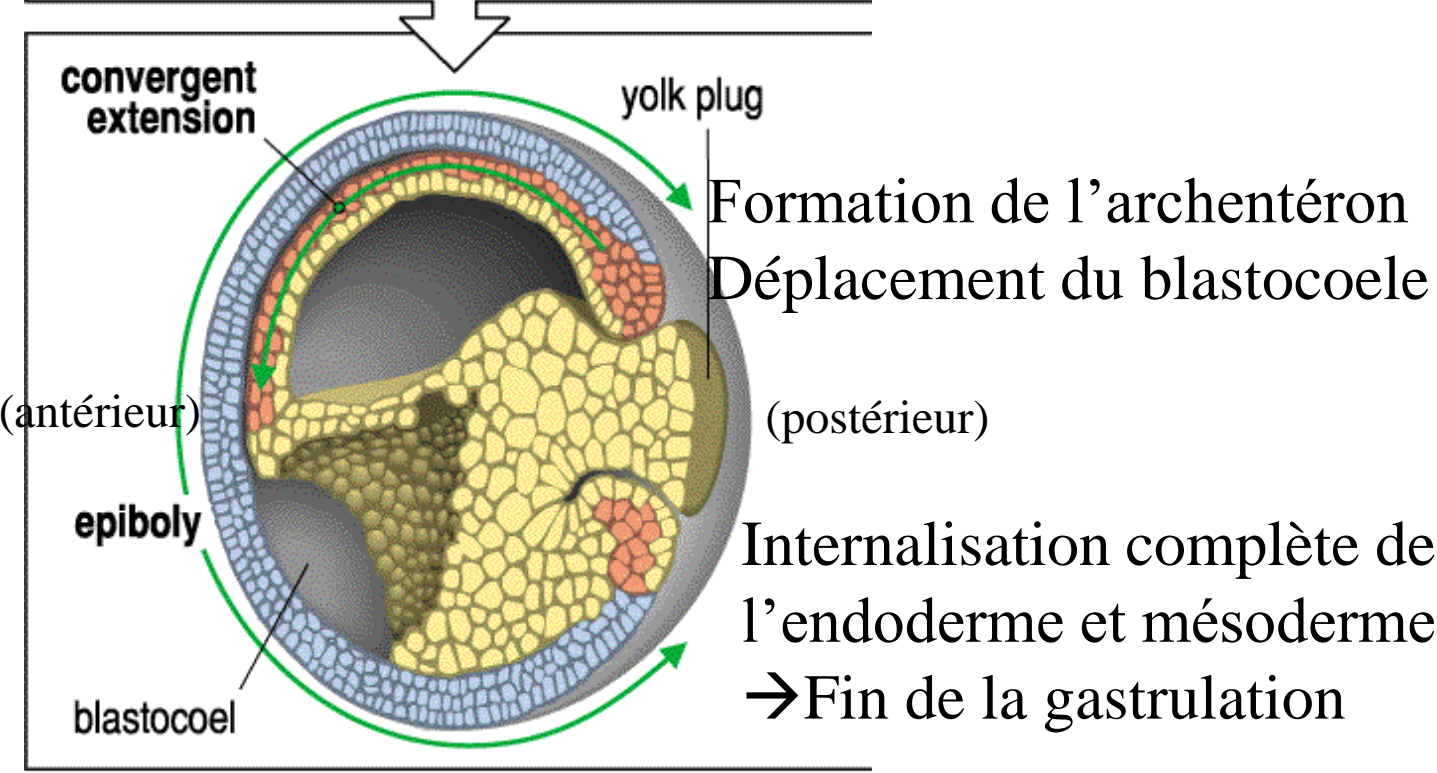
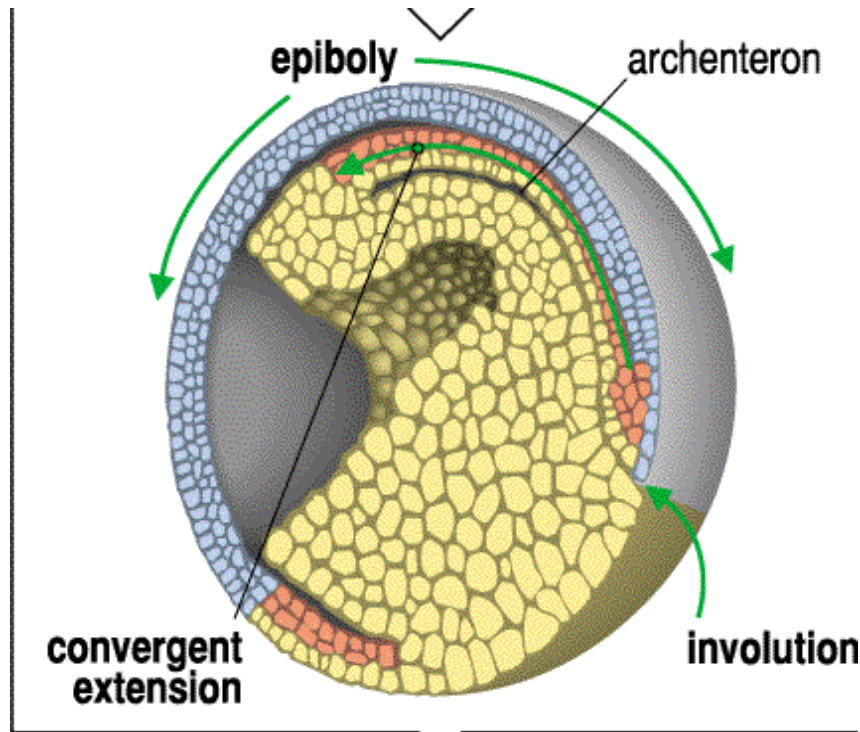
→ Le blastocoele est repoussé du côté opposé.

NB: propagation du mouvement d'involution sur les parties latérales et du côté ventral.

Extension de la lèvre du blastopore

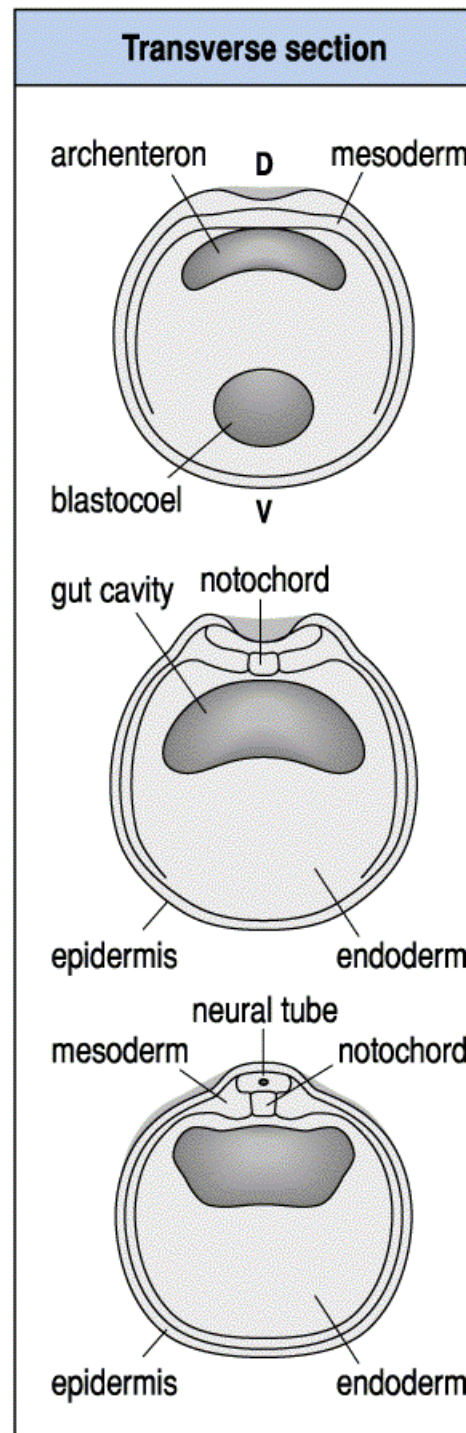
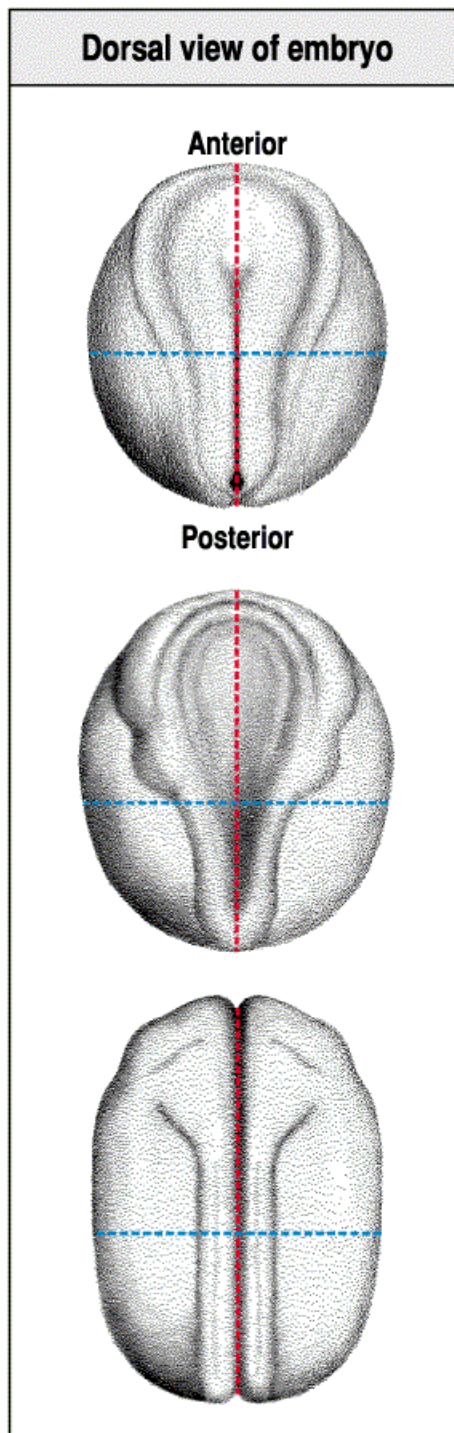
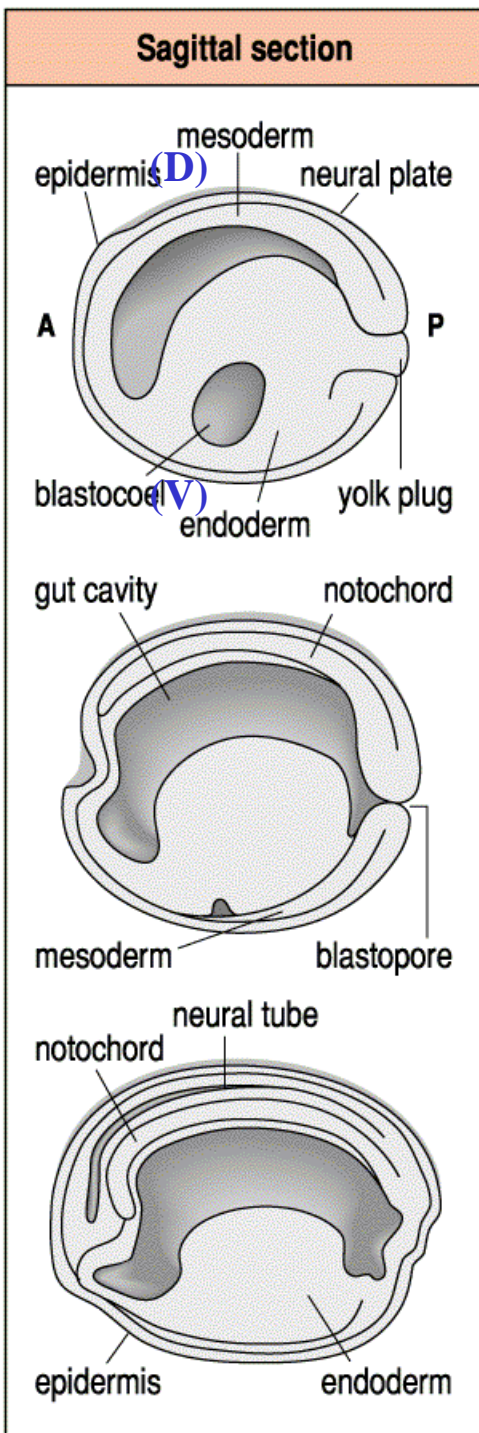


Le mouvement d'épibolie : recouvrement complet de l'embryon par les cellules ectodermiques.



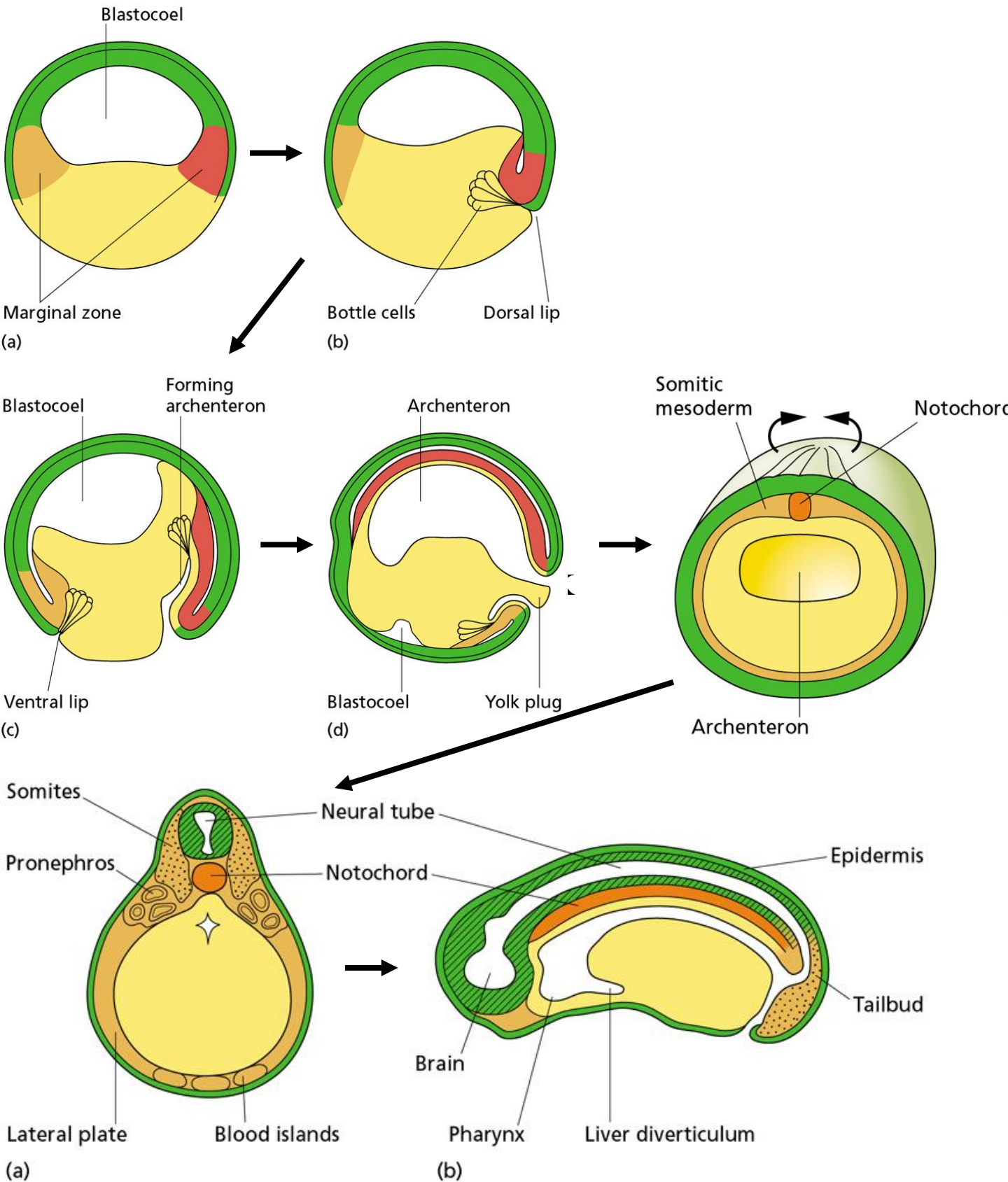
mesoderm ectoderm endoderm

La neurulation chez le xénope



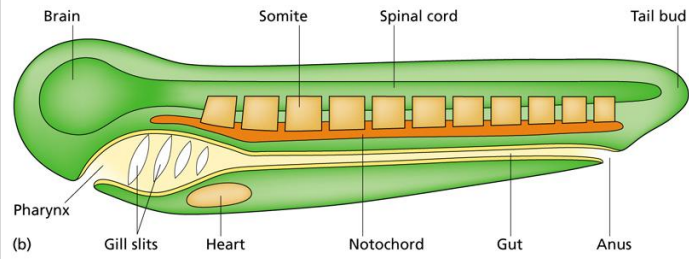
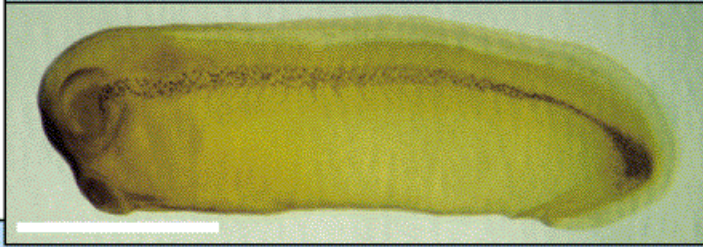
Mésoderme → la notocorde, somites, mésod. Latéral
Ectoderme → tube neural et épiderme

Les mouvements de la gastrulation et neurulation explique la carte de destin au stade blastula

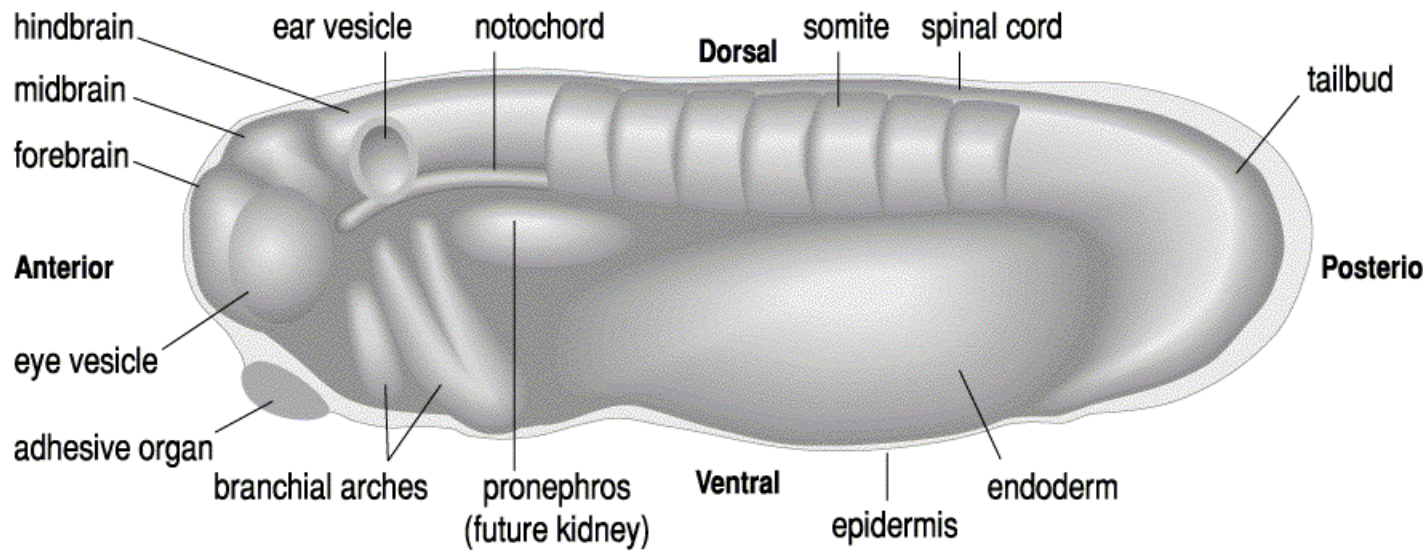


Etape phylotypique

Stage 26 *Xenopus* embryo (tailbud stage)



Schematic of *Xenopus* embryo with epidermis on the left-hand side removed



- + Du côté antérieur, formation :
- Du cerveau (« expansion » du tube neural)
- des vésicules optiques (« invaginations » du cerveau)
- Formation des arcs branchiaux

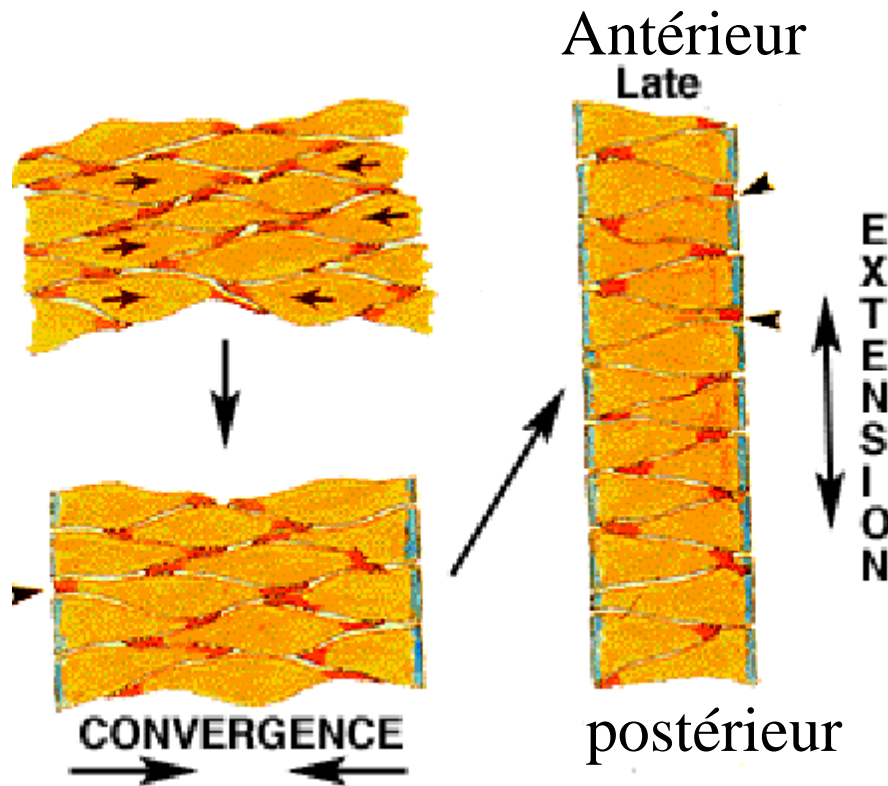
Allongement de l'embryon dans l'axe antéro-postérieur (A-P) par des mouvement de convergence extension.

(voir film du développement du xénope)

<http://xenbase.org/xenbase/original/atlas/movies.html>

Les mouvements de convergence-extension

→ Permet un allongement dans l'axe Antero-Postérieur



(exemple au niveau de la notochorde)

Ces mouvements s'effectuent au niveau des 3 feuillets

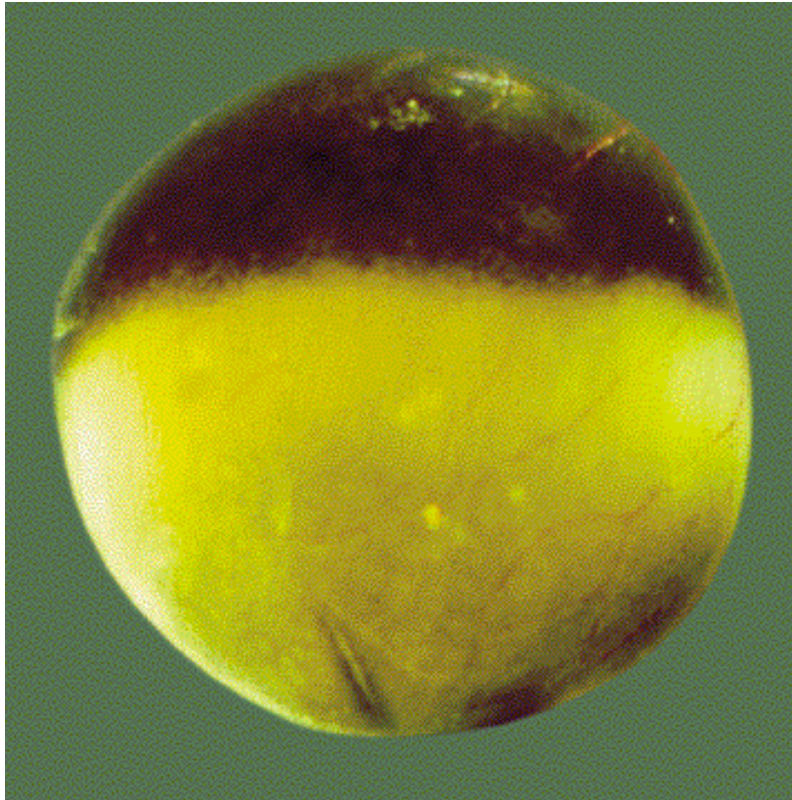
→ Film du développement

Facteurs moléculaires importants impliqués dans les premiers stades de l'embryogenèse

- 1) Facteurs déterminant les axes de l'embryon
(Dorso-ventral , Antéro-postérieur, Gauche-droite)

- 2) Facteurs impliqués dans l'établissement des trois feuillets : Différentiation cellulaire :
Endoderme, mésoderme et ectoderme

1) Détermination des axes chez le xénope



L'ovule non fécondé a une « polarité » :

Pôle végétal contient les réserves nutritives
mais également des facteurs régulateurs :

Protéines ou RNAm : **facteurs régulateurs maternels**
(synthétisés lors de l'ovogenèse)

Il existe deux types de facteurs maternels :

- 1) déterminant dorsal → axe dorso-ventral**
- 2) déterminant végétal → endoderme**

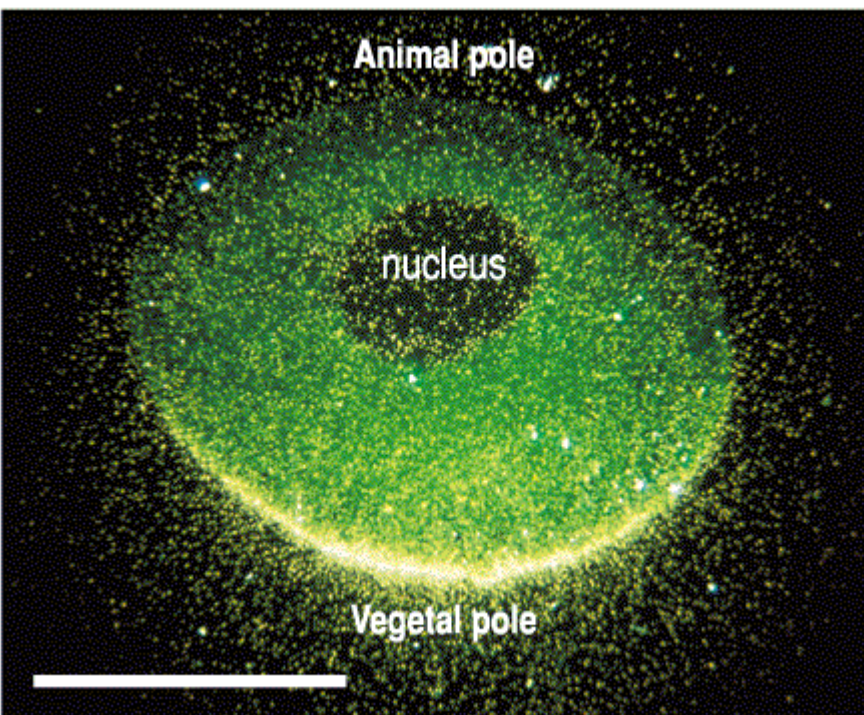
Mise en évidence de ces facteurs maternels dans le **pôle végétal** :

Par hybridation in situ (pour ARNm)

Par immunofluorescence (pour les protéines)

exemple : ARNm de **Vg1** (facteur de type TGFbeta)

ARNm de **VegT** (facteur transcription type T)



: ARNm de Vg1

→ **spécification**
-de l'endoderme
(au pôle végétale)

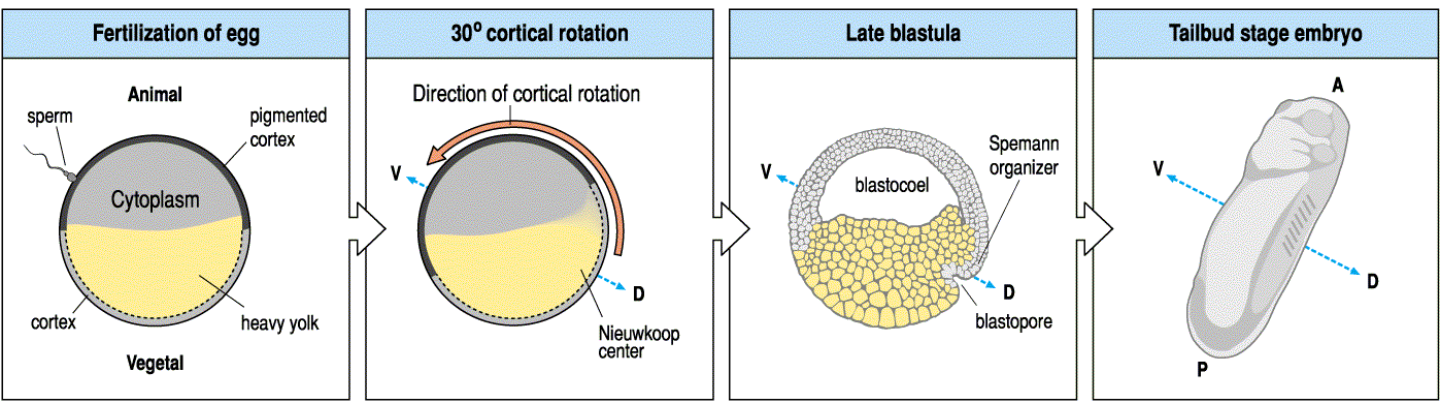
-de l'axe A-P
(similaire à l'axe pôle
animal-végétal)

Les facteurs maternels vont activer les gènes au stade MBT

→ cascade d'induction (cascade régulatrice)

Détermination de l'axe Dorso-Ventral chez le xénope

L'axe D-V est déterminé lors de la fécondation

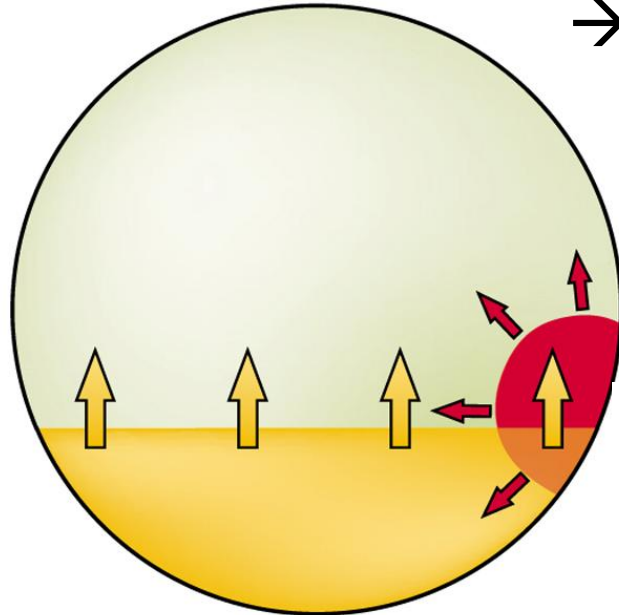


Fécondation → rotation corticale → perte de symétrie radiale : site de fécondation = côté ventral

Déplacement des facteurs maternels dorsalisants

(« déterminants dorsalisants »)

→ centre de signalisation de Nieuwkoop



Centre de Nieuwkoop

Vegetal hemisphere



Déterminant végétal (non déplacé) : VegT et Vg1

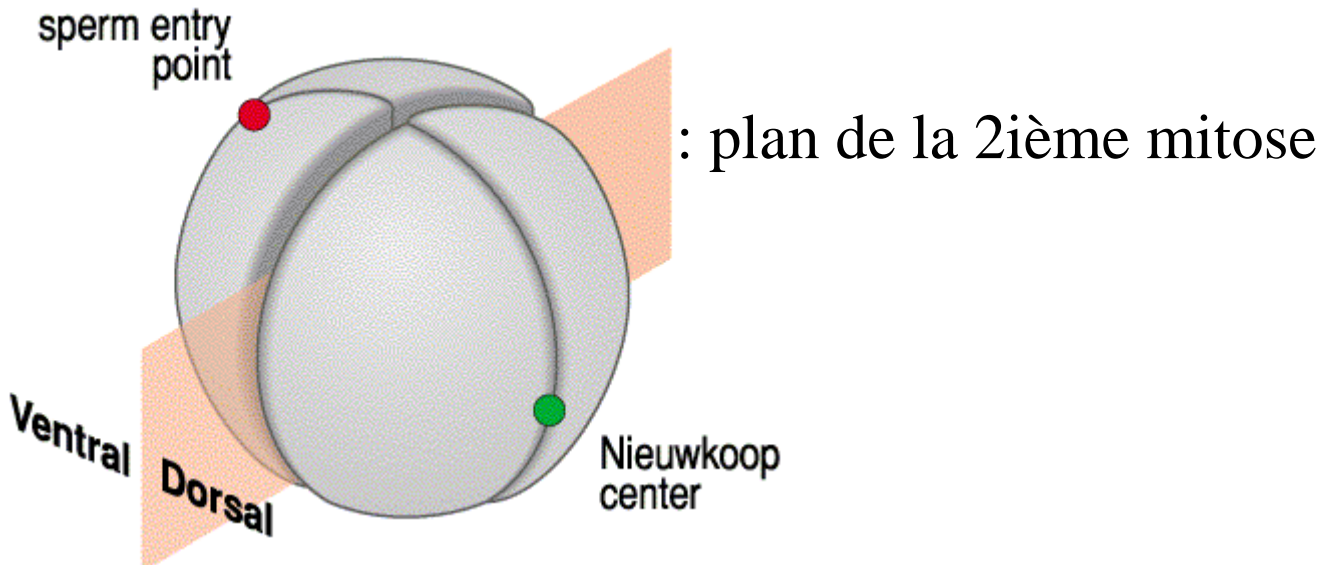
→ spécification de l'endoderme



Déterminant dorsal (déplacé par la rotation)(centre de Nieuwkoop)

Centre de Nieuwkoop

Le centre de signalisation de Nieuwkoop (stade zygote) est localisé à l'opposé du site de fécondation.

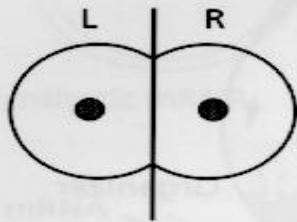


-Le premier clivage passe par le site de fécondation et le pôle animal (→ axe gauche-droite)

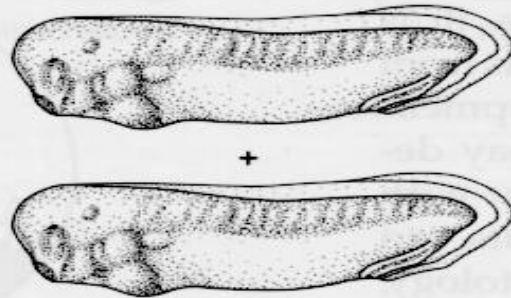
-Le deuxième clivage sépare le côté dorsal du ventral

→ Implication sur le développement des « embryons clivés » (expériences de Nieuwkoop 1970 → 1980)

Axe clivage1

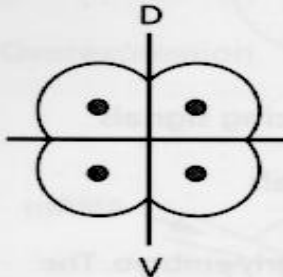


(a) Lateral

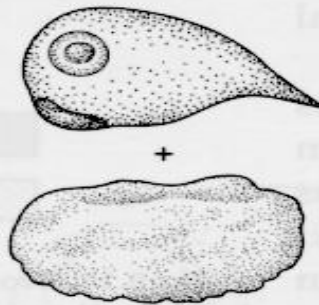


Twins

Axe clivage2



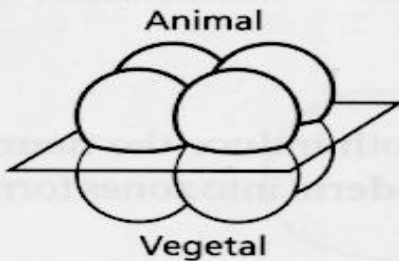
(b) Frontal



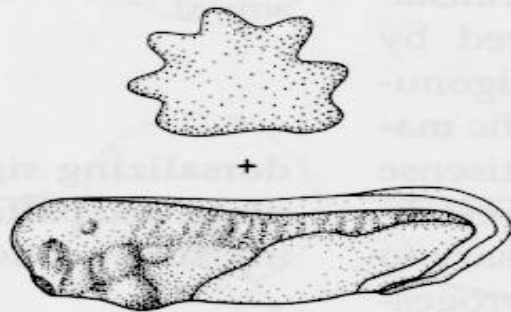
Dorsalized

'Belly piece'

Axe clivage3



(c) Equatorial



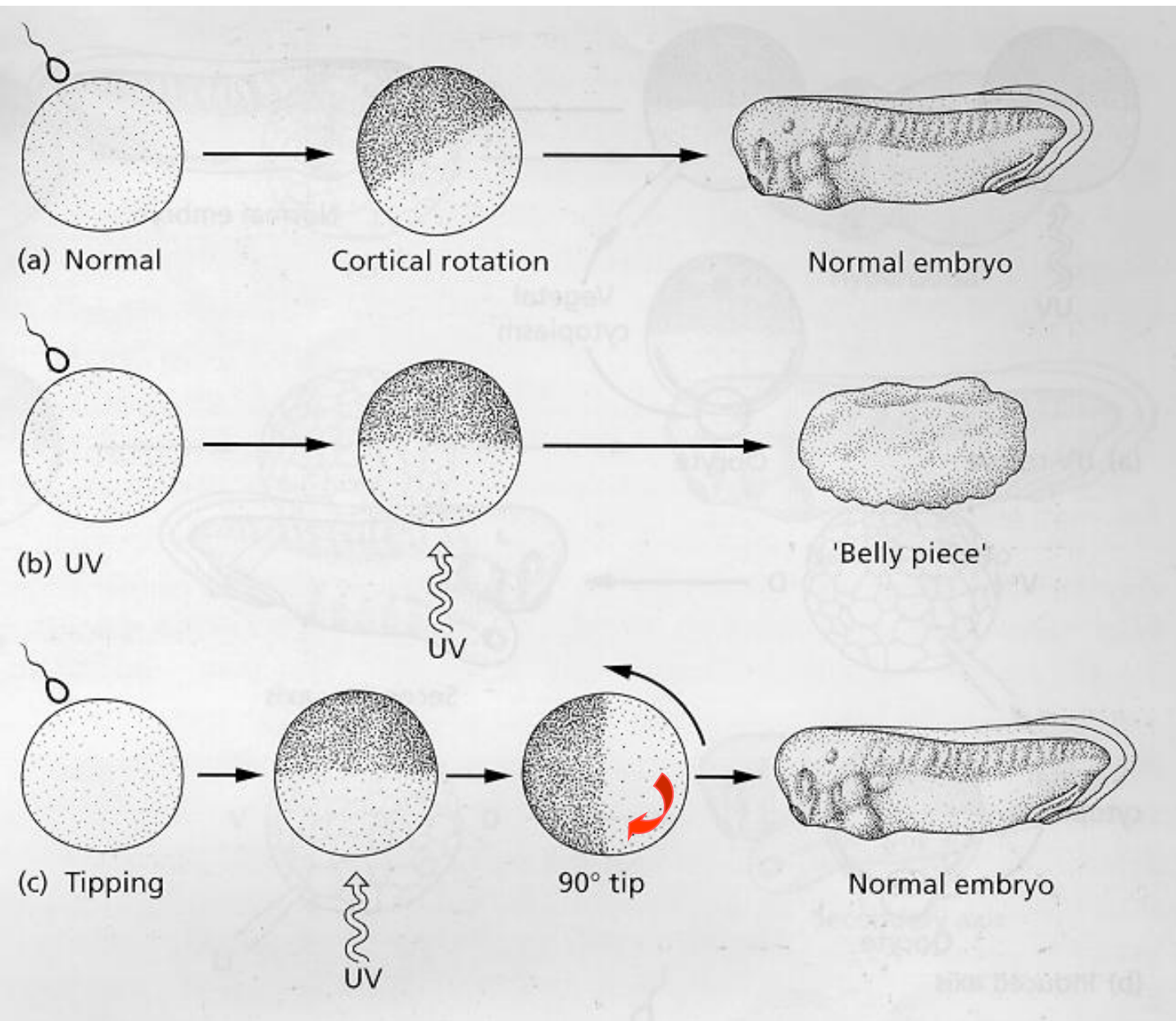
Epidermis

Short of epidermis

→ Importance des facteurs maternels du pôle végétal et du pôle dorsal (centre de Nieuwkoop)

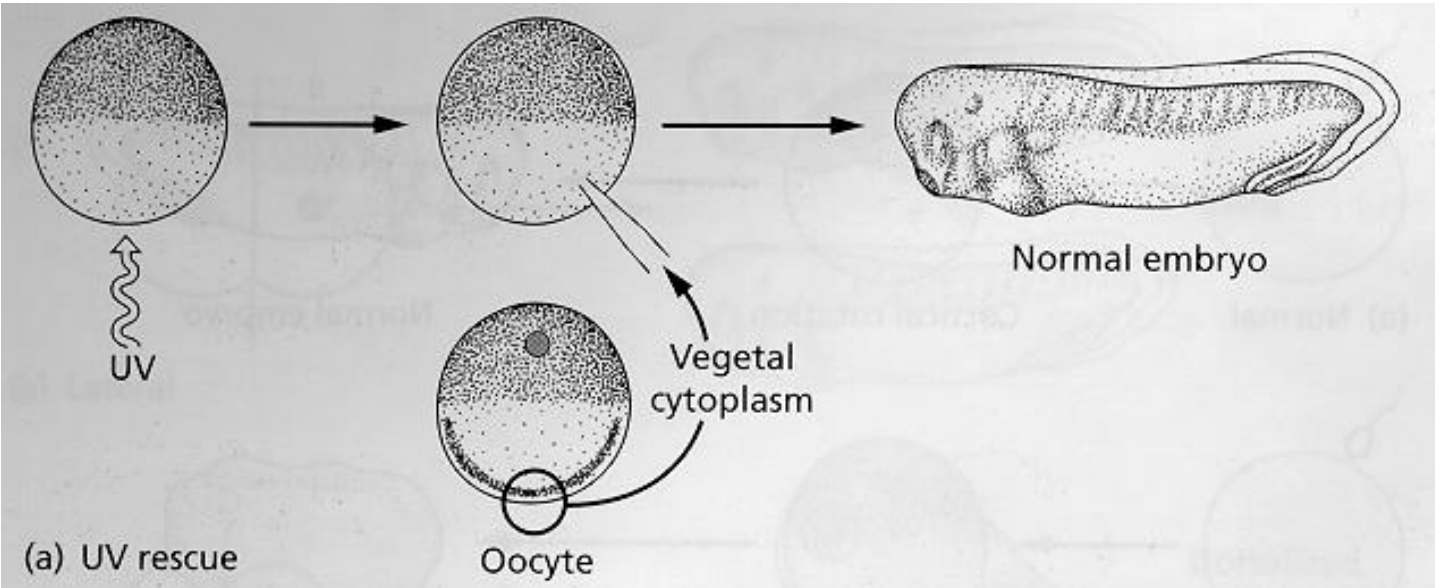
Expériences démontrant le rôle de la rotation corticale sur la localisation des déterminants dorsaux :

- effet des agents bloquant l'action des microtubules (nocodazole, irradiation aux UV)
- et « récupération » (« rescue ») par orientation du zygote

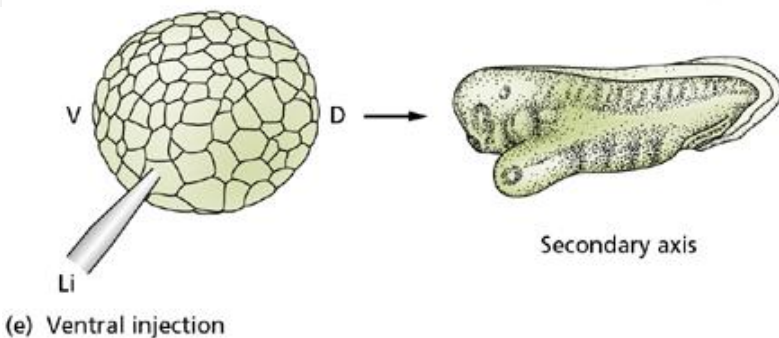
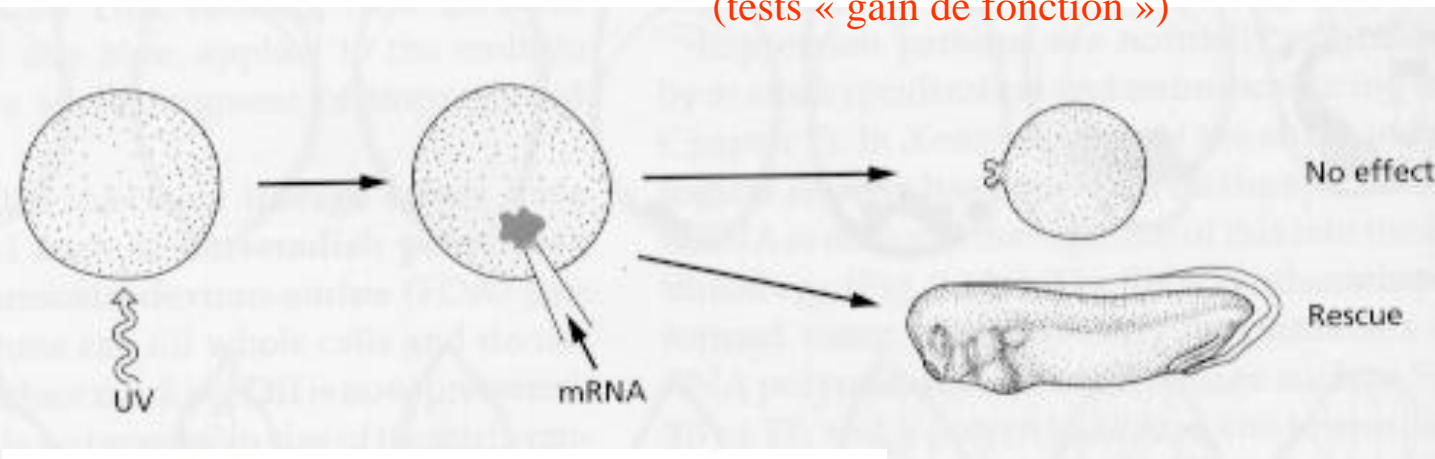


Les déterminants « dorsalisants » sont localisés au pôle végétal avant la fécondation.

→ la rotation cortical les déplace du côté dorsal



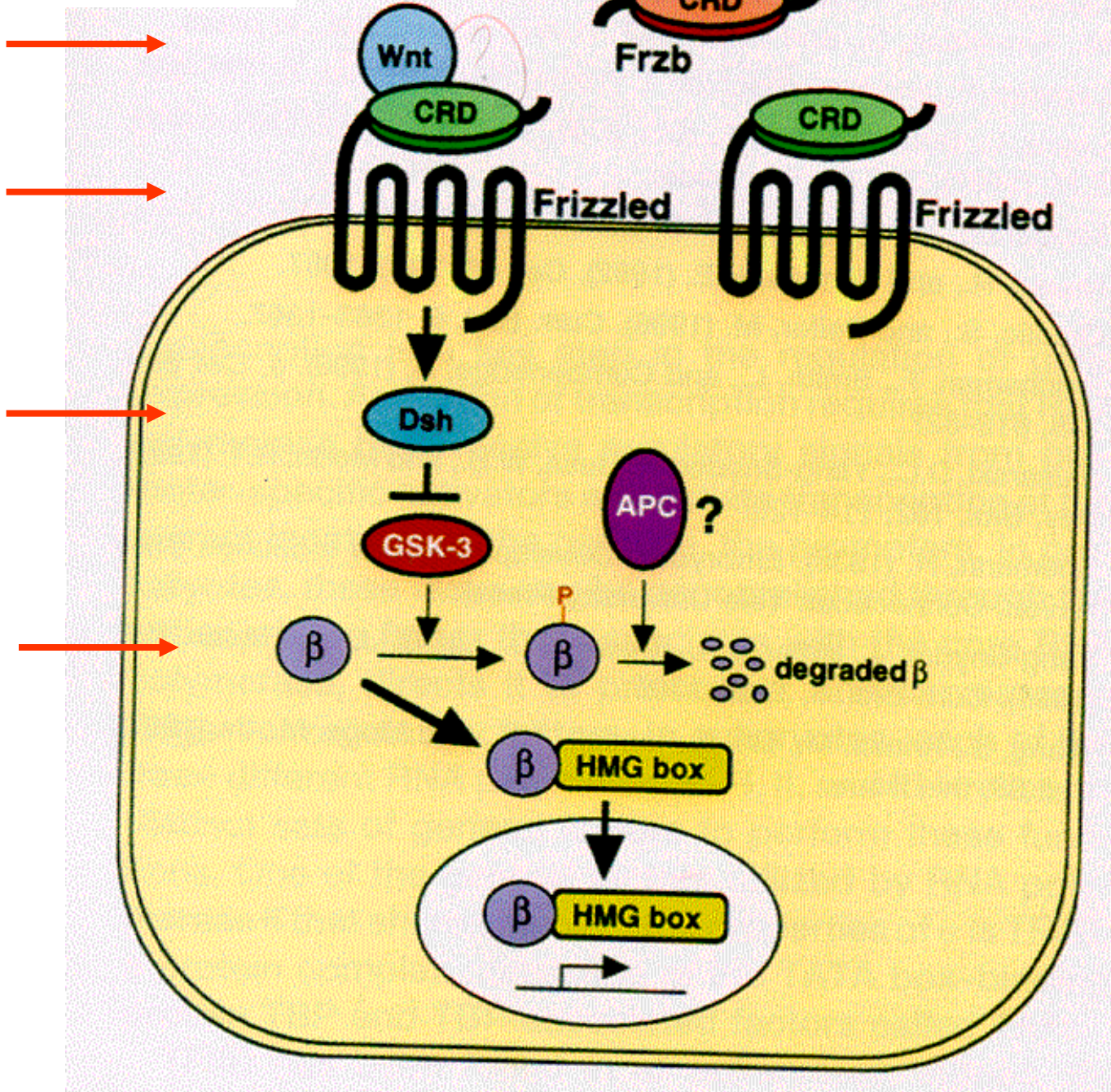
→ Identification de facteurs par expériences de « rescue » (sauvetage) (tests « gain de fonction »)



β -Caténine
facteur Wnt
frizzled
Disheveled

La voie de transduction des protéines Wnt

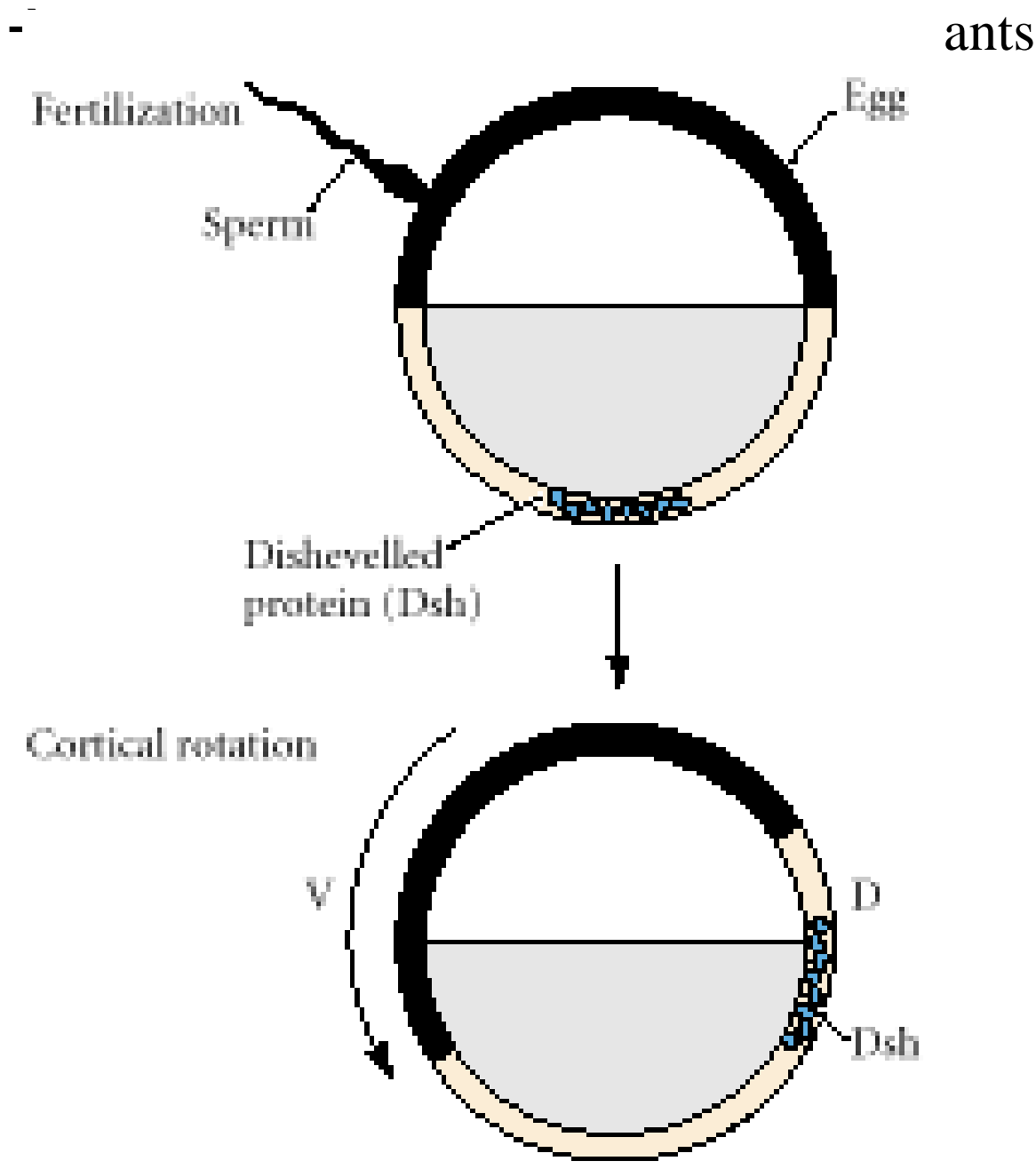
« rescue » de
l'effet des UV

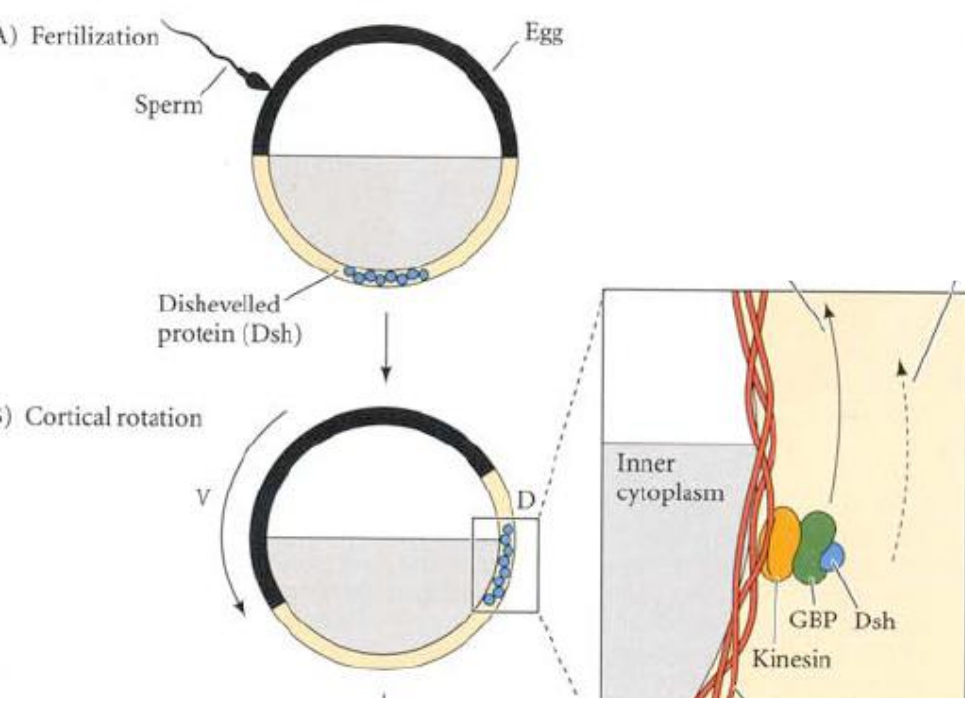


→ Lequel de ces facteurs est le déterminant dorsal ?

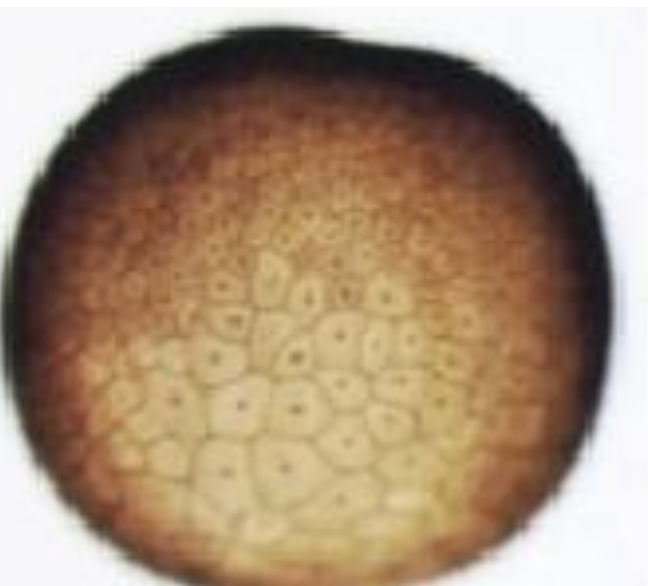
-Les protéines **Dishevelled** et **GBP** (GSK3-Binding Protein) sont localisées au pôle végétal avant la fécondation .

-Relocalisée dans le centre de Nieuwkoop après la rotation corticale:

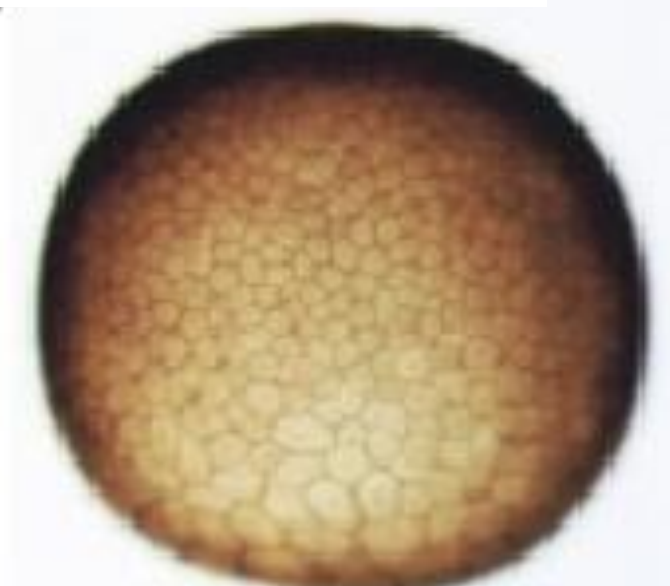




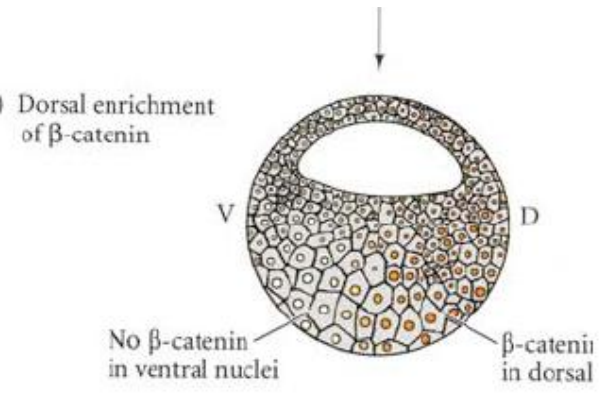
Immunohistochimie beta-caténine



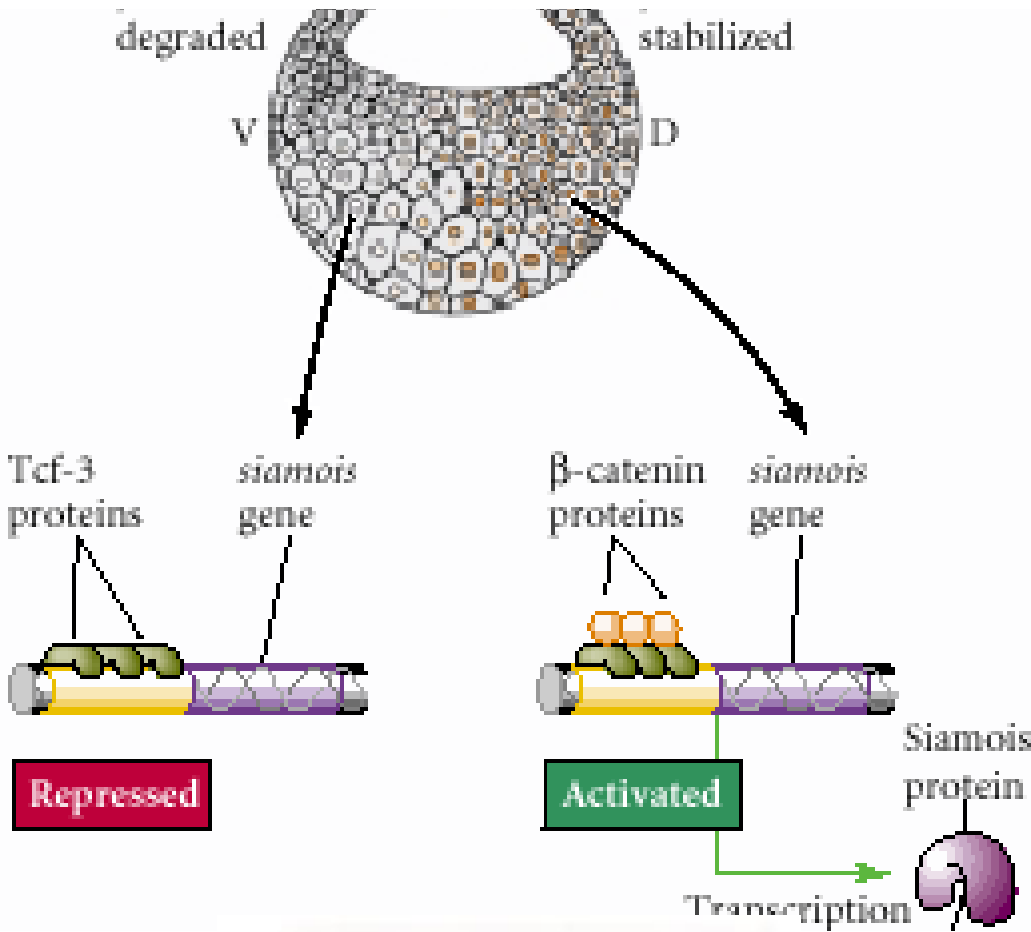
Coté dorsal



Coté ventral



Action de la Béta-caténine nucléaire



Siamois : fact. Transcriptionnel à homéodomaine

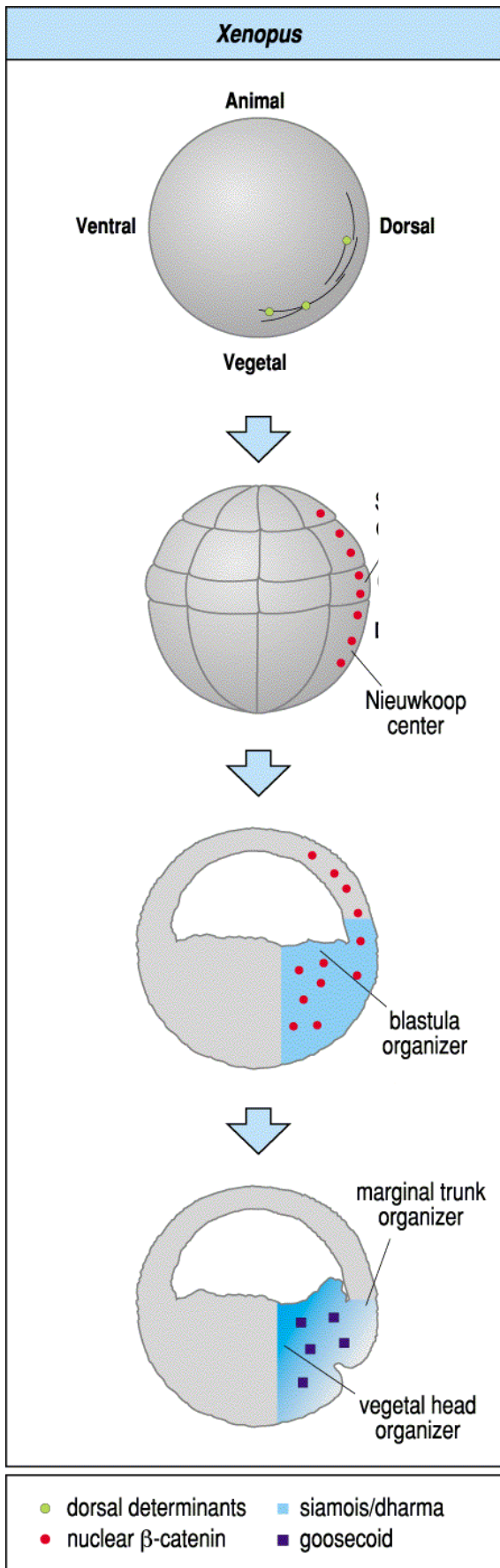
Expression dans le centre de Nieuwkoop (Hybrid. In situ)

(Stade fin blastula)



: injection de l'ARNm siamois du coté ventral au stade 8 à 16 cellules (idem avec Dsh ou beta-caténine)

Conclusions sur l'axe dorso-ventral



Chez les **batraciens**, l'axe Dorso-Ventral est déterminé lors de la fécondation → rotation corticale
→ Localisation de Dishevelled du côté dorsal : centre de Nieuwkoop. (formé juste après fécondation)

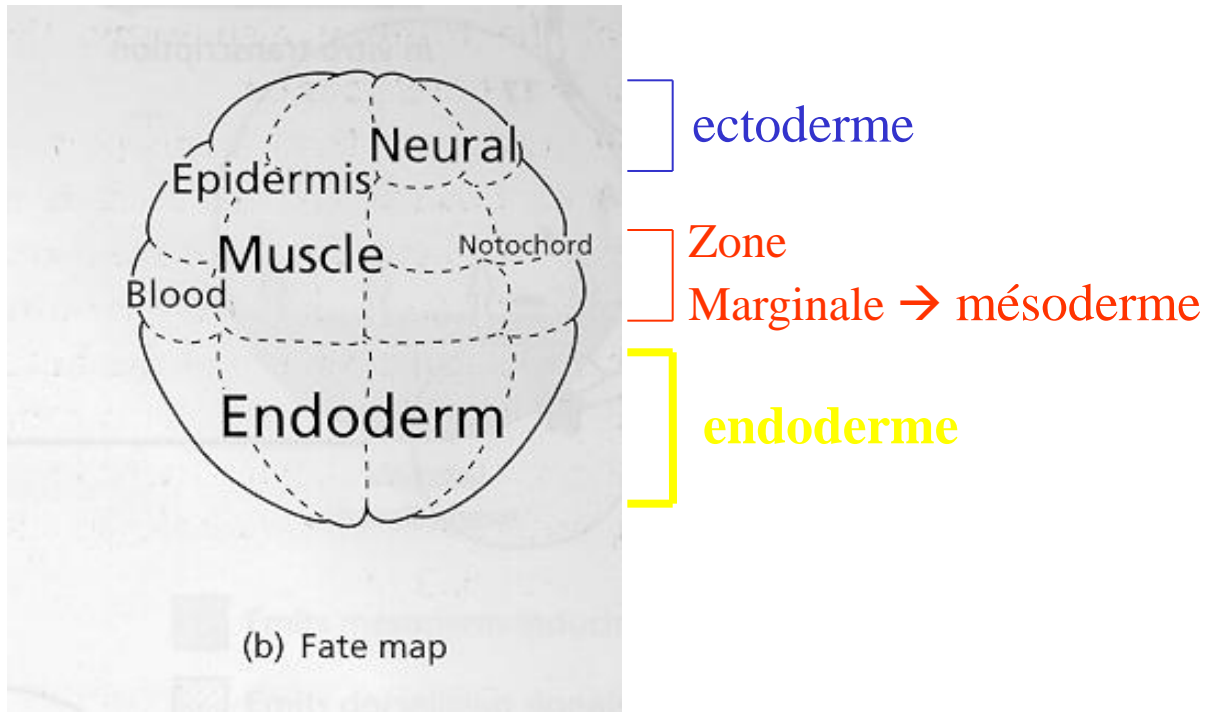
→ activation de la voie Wnt

→ Activation de Siamois

→ stimule l'induction du centre de Spemann (gène goosecoïde)

2) Détermination des feuilletts chez le xénope

Carte de destin (stade blastula)
(injection de molécules fluorescentes)

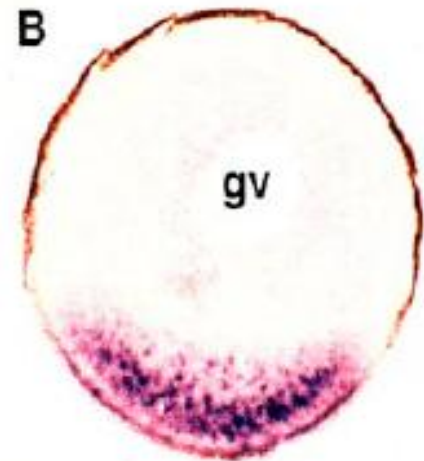


→ Pourquoi les 3 feuilletts proviennent de ces régions précises ? Quels sont les facteurs déterminant la formation des 3 feuilletts ?

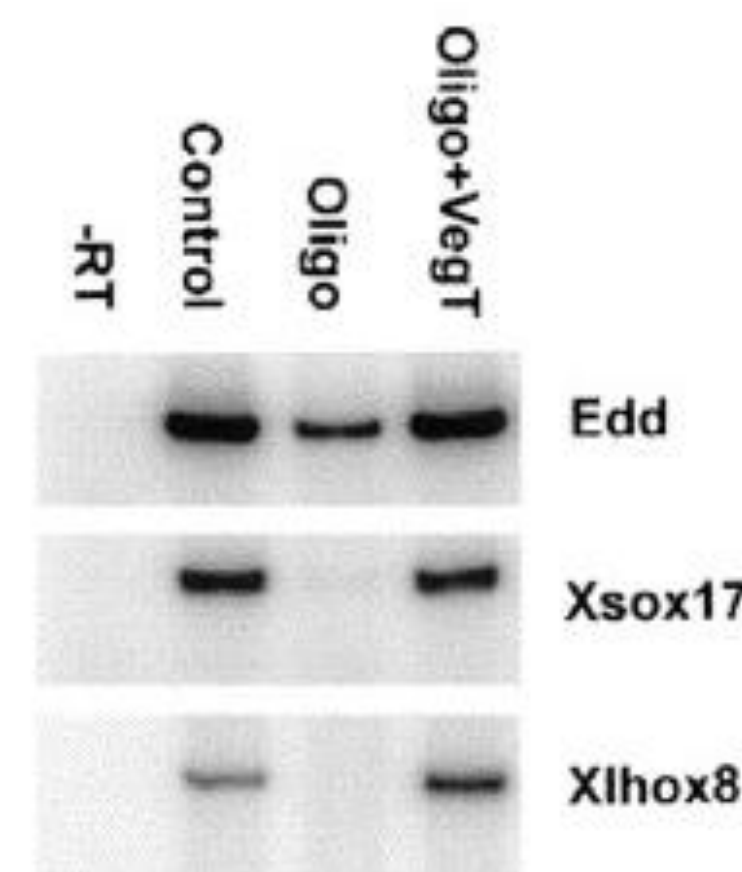
L'endoderme est spécifié par des **facteurs maternels** localisés au pôle végétal : **VegT** : **facteur de transcription (famille T)**

Evidences :

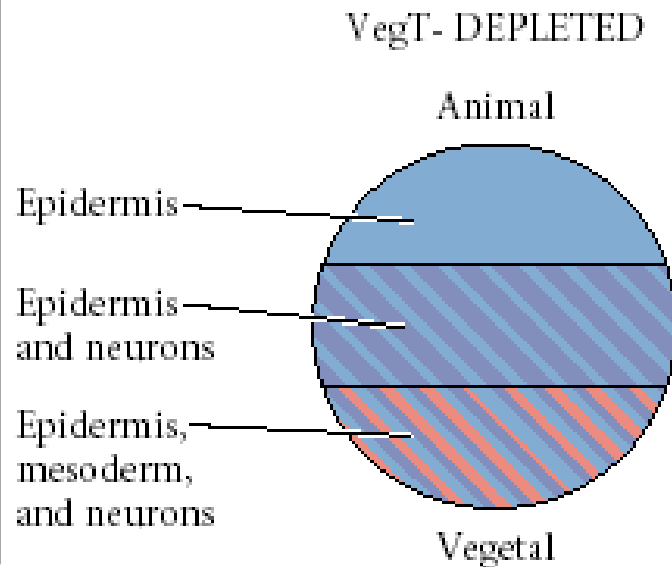
1) L'ARNm de VegT est localisé au pôle végétal. (hybridation in situ)



2) L'injection au pôle animal va transformer ces cellules en



expression de morpholino antisens) endoderme



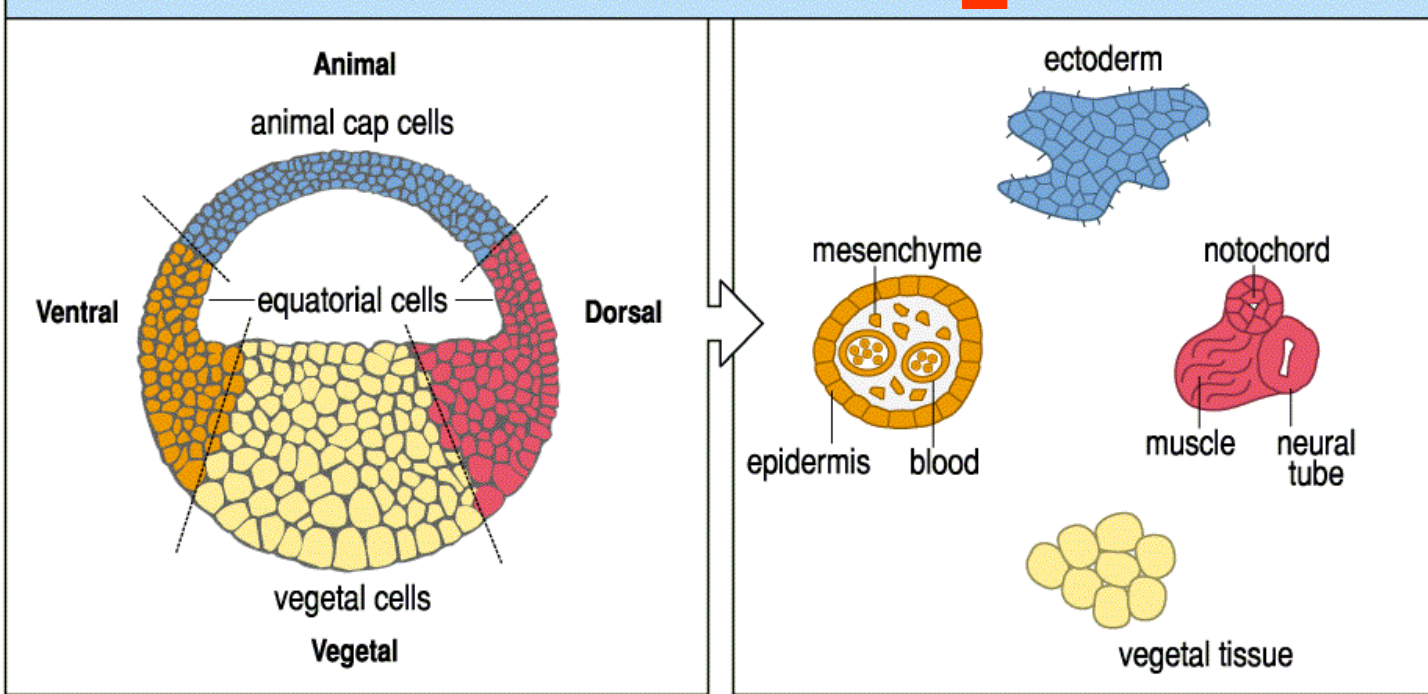
Cascade régulatrice autonome formant l'endoderme

VegT → Nodal → Mixer → Sox17 (endoderme)

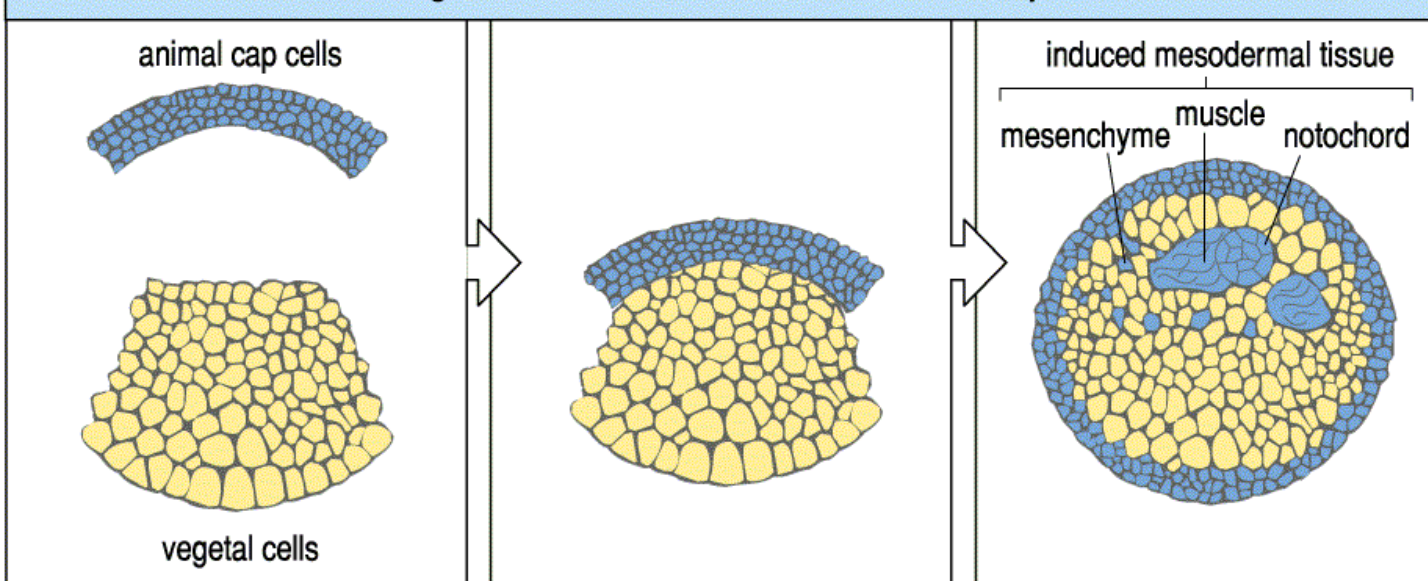
(Voir cours 5 et 8)

Comment sont spécifiés le mésoderme et l'ectoderme ? ... par des facteurs maternels ??

Tissues formed from explants from a *Xenopus* late blastula



Vegetal tissue induces mesoderm in animal cap



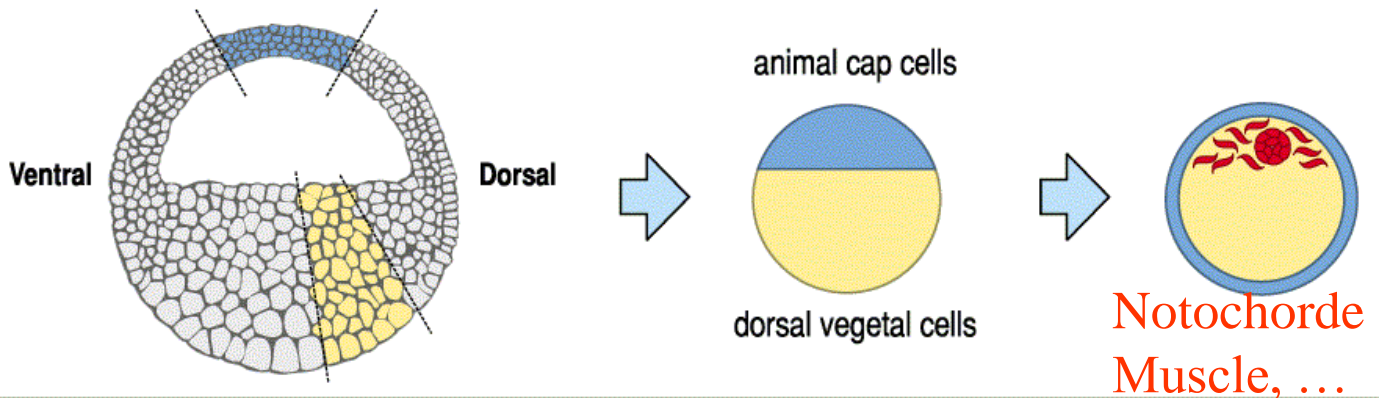
→ Signaux émis par les cellules endodermiques (passant à travers des membranes → extracellulaires)

→ **L'endoderme induit le mésoderme**

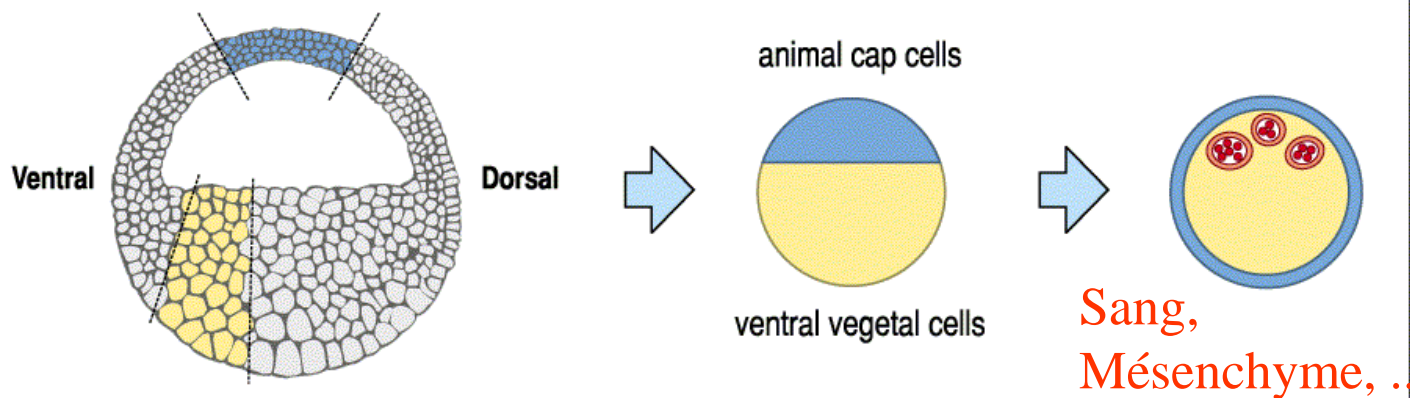
(NB: confirmé par le « knock-down » de VegT)

Différence d'induction par l'endoderme ventral et l'endoderme dorsal (centre de Nieuwkoop)

Dorsal vegetal cells induce muscle and notochord from animal cap cells



Ventral vegetal cells induce blood and associated tissue from animal cap cells



→ Différence de signalisation (qualitatif ou quantitatif)

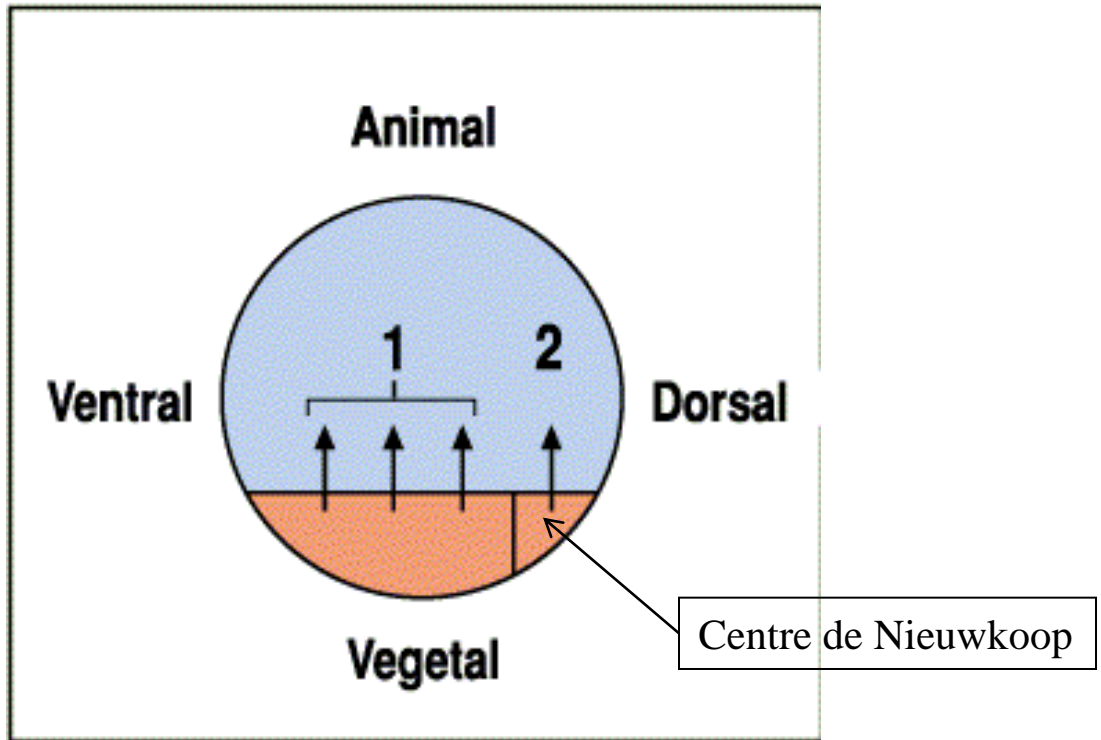
Conclusions :

→ Endoderme dorsal induit du mésoderme dorsal.

→ Endoderme ventral induit du mésoderme ventral.

Modèle d'induction du mésoderme ...

-Des signaux (1 et 2) sont produit par l'endoderme et induisent du mésoderme ventral et dorsal.



→ Activation de l'expression de facteurs de transcription → différenciation

- Signal 1 et 2 induit le mésoderme

ex : **Brachyury** (facteur de transcription type T)

chez la souris = gène « *Tail* »

chez le zebrafish = gène « *no tail* »

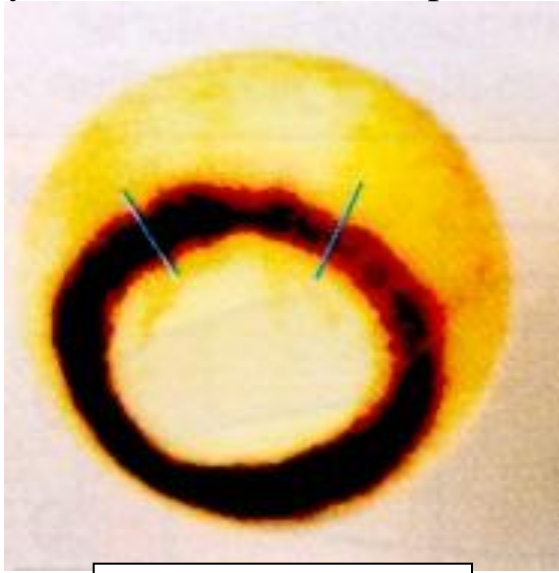
- signal 2 induit le **mésoderme dorsal**

qui génèrera la notochorde et la plaque préchordale

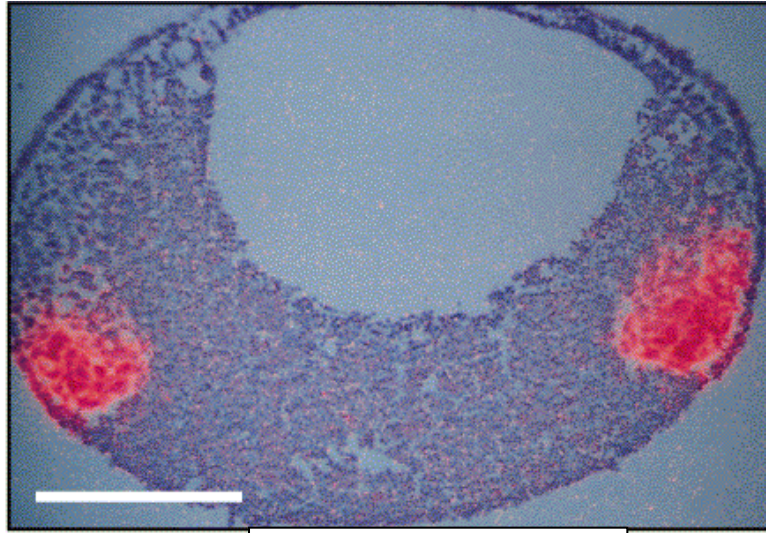
ex : **not, gooseoid** (homéodomaine)

Brachyury : « marqueur » des cellules mésodermiques

(hybridation in situ ; xenopus late blastula)

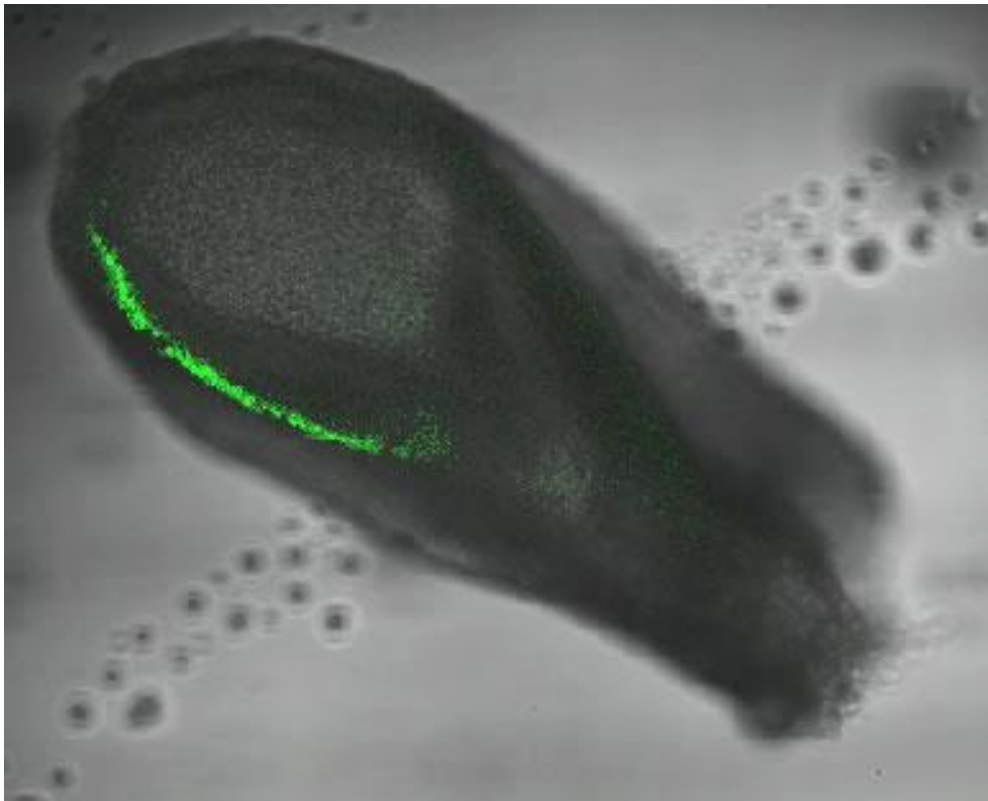


X-Brachyury



X-Brachyury

Profil d'expression du gène tail / brachyury chez la souris



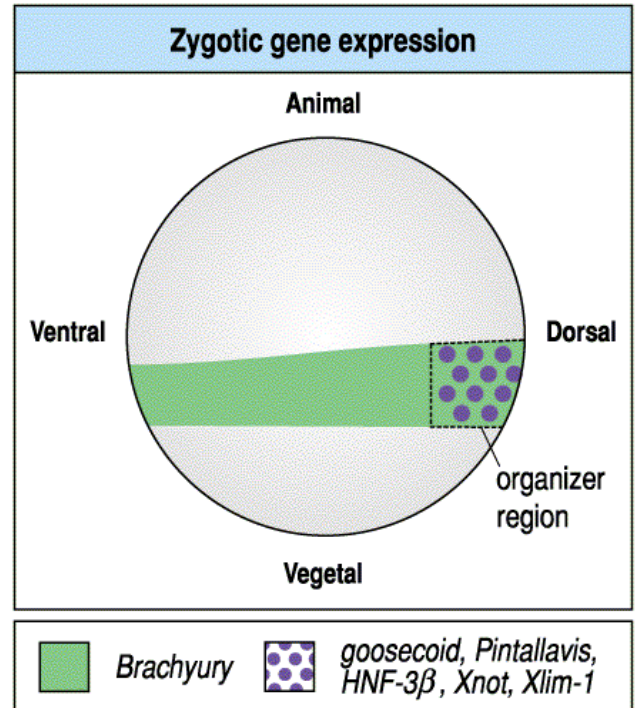
Marqueurs du mésoderme dorsal (organisateur de Spemann) :

X-Goosecoïd (homeodomain)

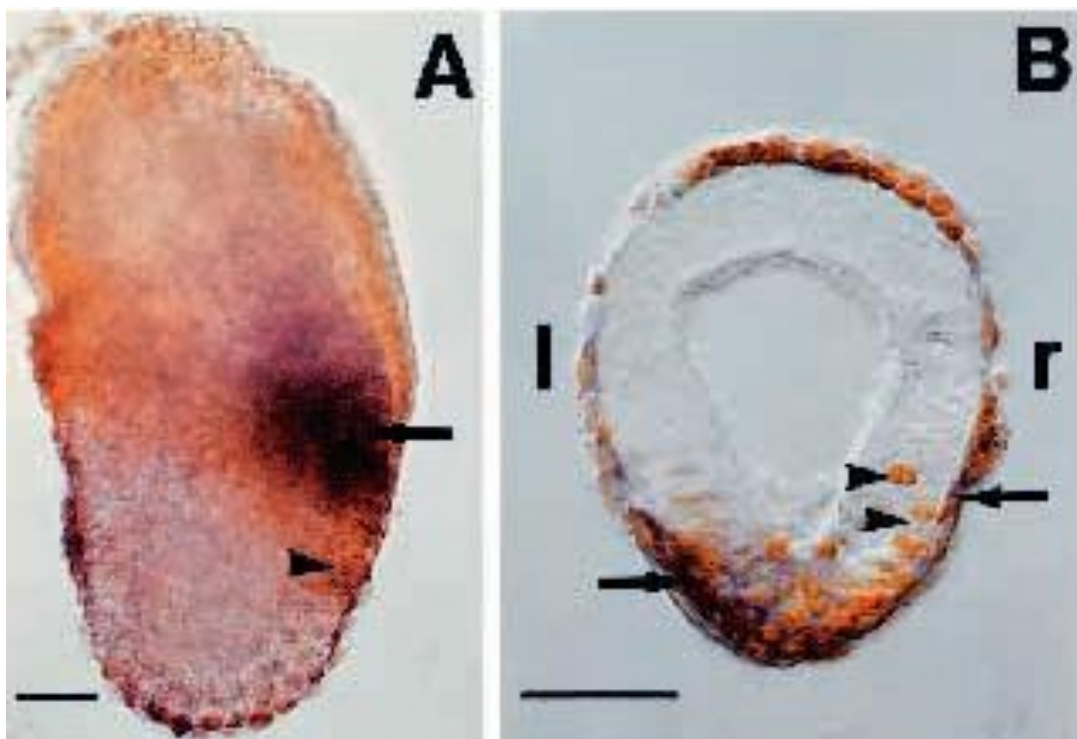
X-not (homeodomain)

(hybridation in situ)

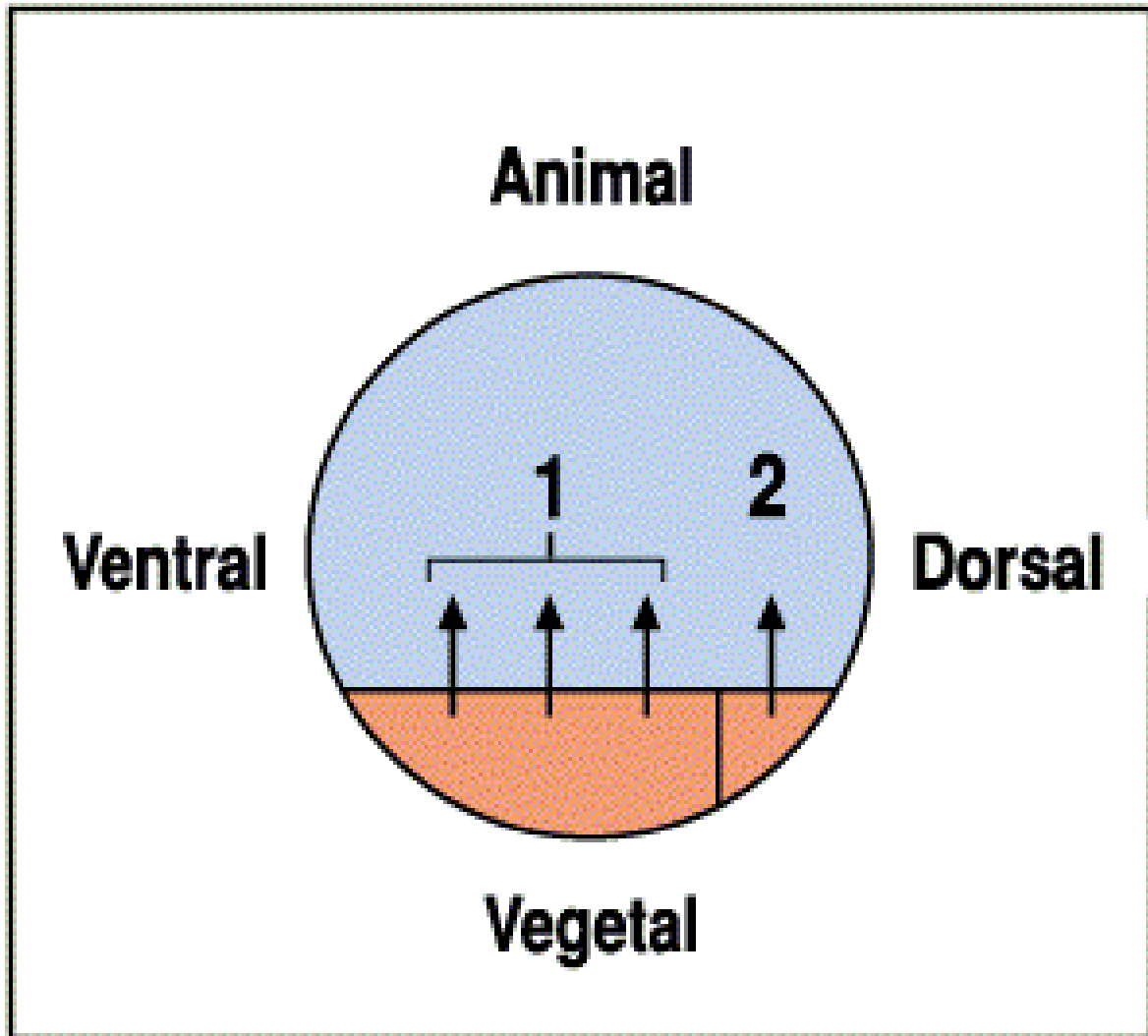
X-goosecoïd
(vue du pôle végétal)



Profil d'expression de *goosecoïd* chez la souris



Modèle d'induction du mésoderme ...



→ Identification des signaux 1 et 2

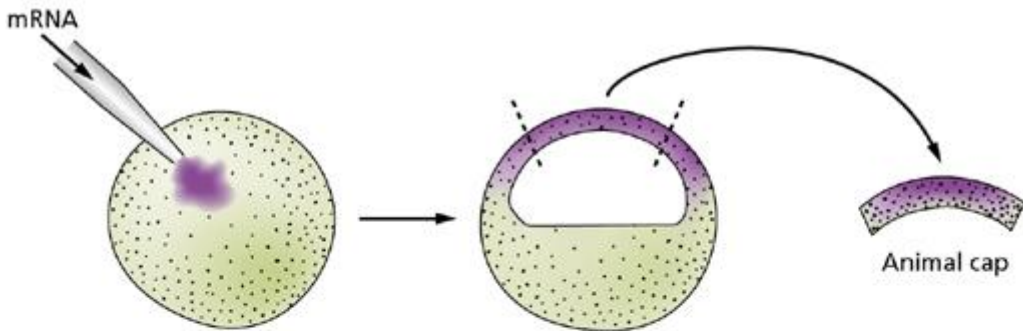
(entre 1990 et 2005)

Identité des signaux

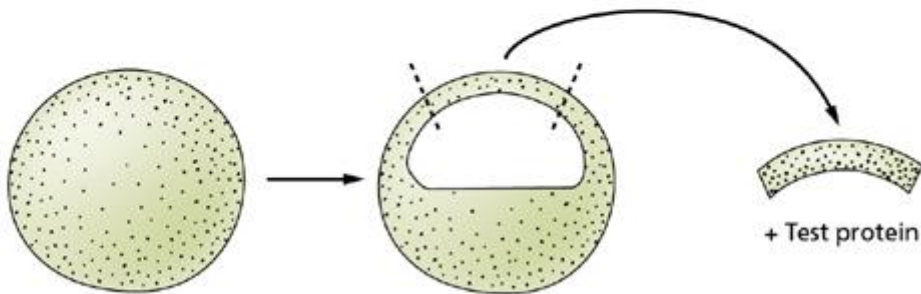
A) Les Signaux 1 et 2 : induction du mésoderme

Mise en évidence par des expériences de gain de fct :

- 1) Test 1 : Injection d'ARNm et analyse des « calotte animale »
- 2) Test 2 : Incubation des explants ectodermiques avec le facteur de signalisation



(a) Autoinduction



(b) Animal cap assay

→ Identification de facteurs de signalisation de la famille **TGF β**

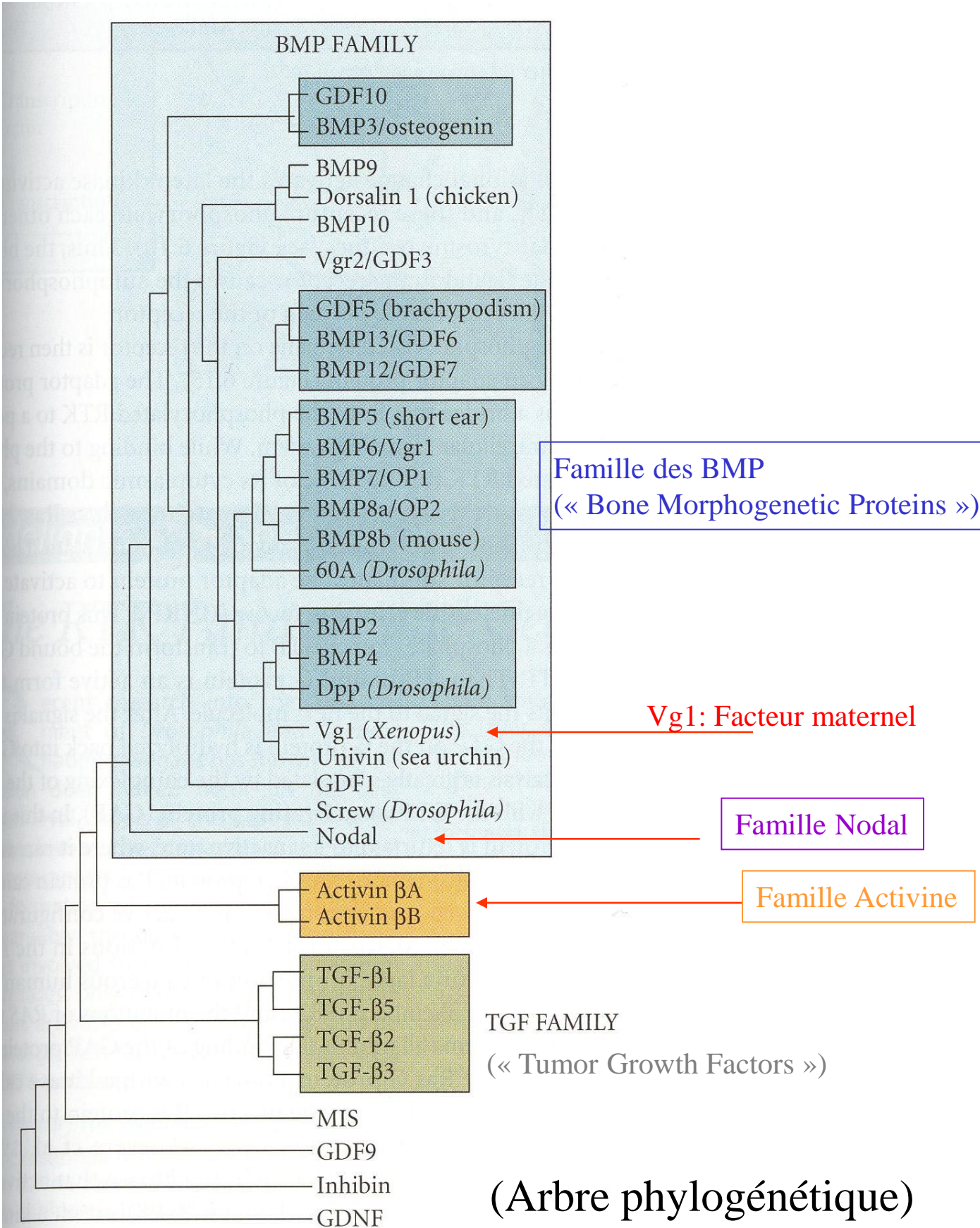
- **Vg1**

- **activine**

- facteurs **nodal** « Xnr » (Xenopus Nodal Related)

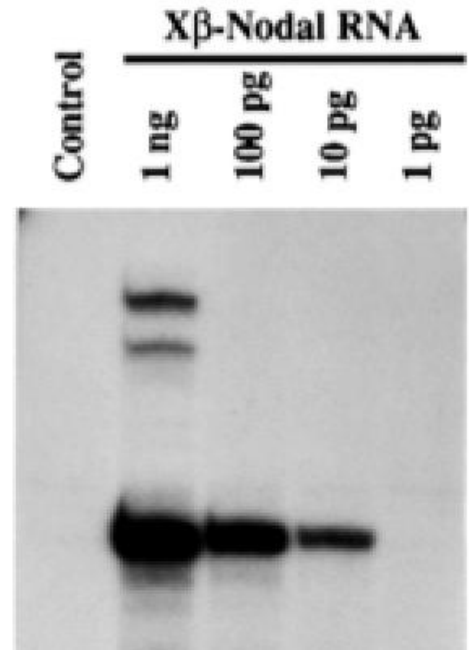
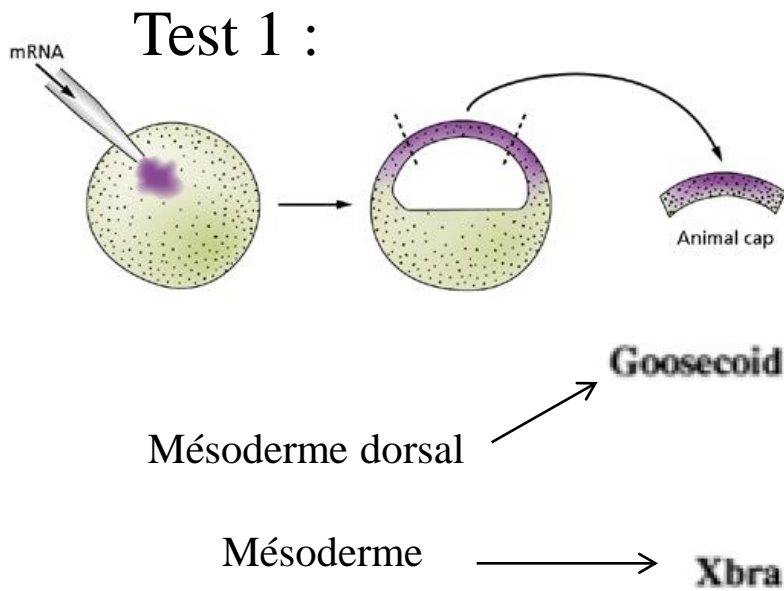
La superfamille des facteurs TGF- β

(protéines extracellulaires de signalisation)

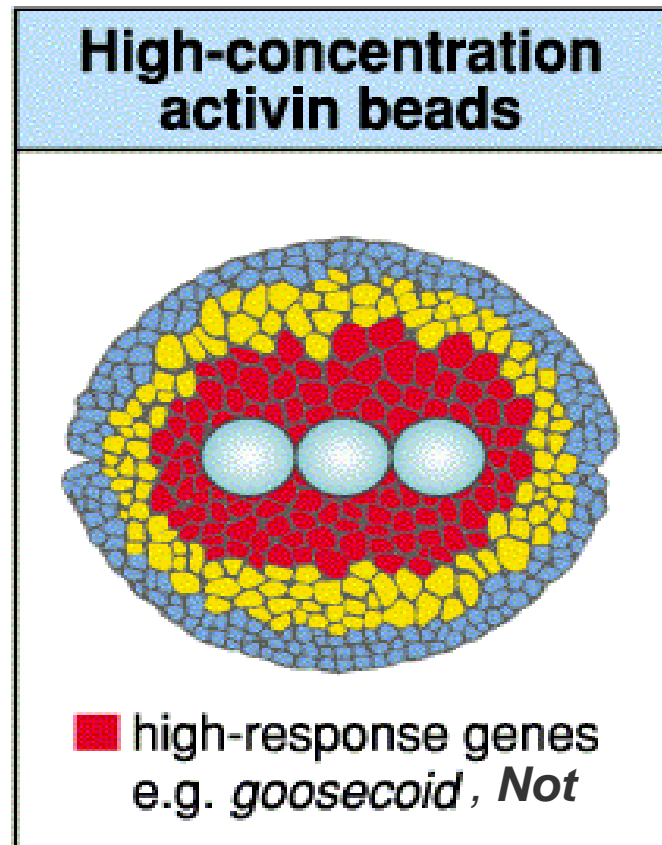
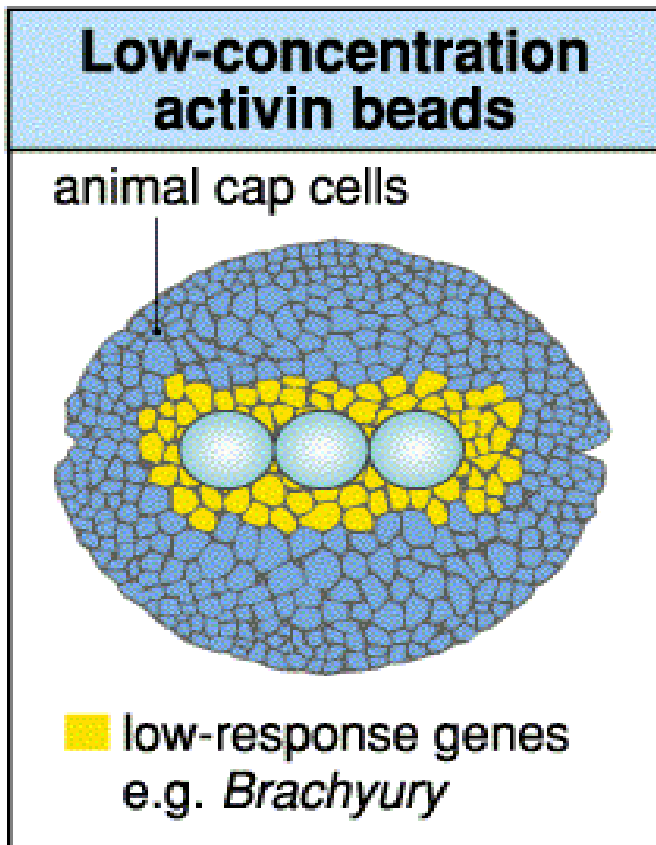


(Arbre phylogénétique)

Effet morphogène de l'activine, Vg1 et Nodal



Test 2 :



Signaux 1 et 2 = gradient de facteurs Nodal



Hybridation in situ révélant l'ARNm de Xnr1 juste après la « Mid Blastula Transition »

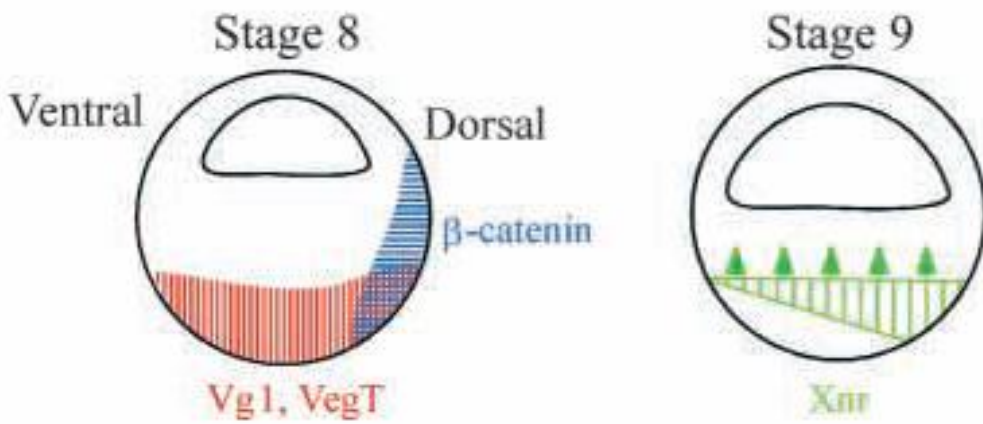
→ Confirmation du rôle d'induction par perte de *fct* (injection morpholino Xnr1 et Xnr2)

(condition importante)

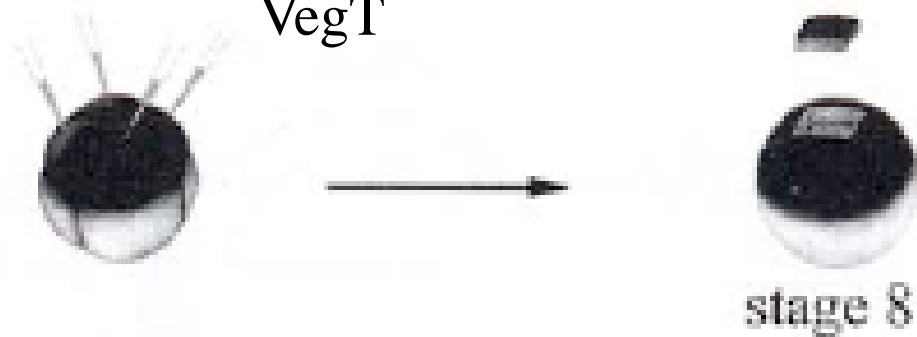
(participation « mineure » de Vg1 et activine)

→ Pourquoi Xnr1 et 2 sont-ils exprimés en gradient dorso-ventral dans l'endoderme ?

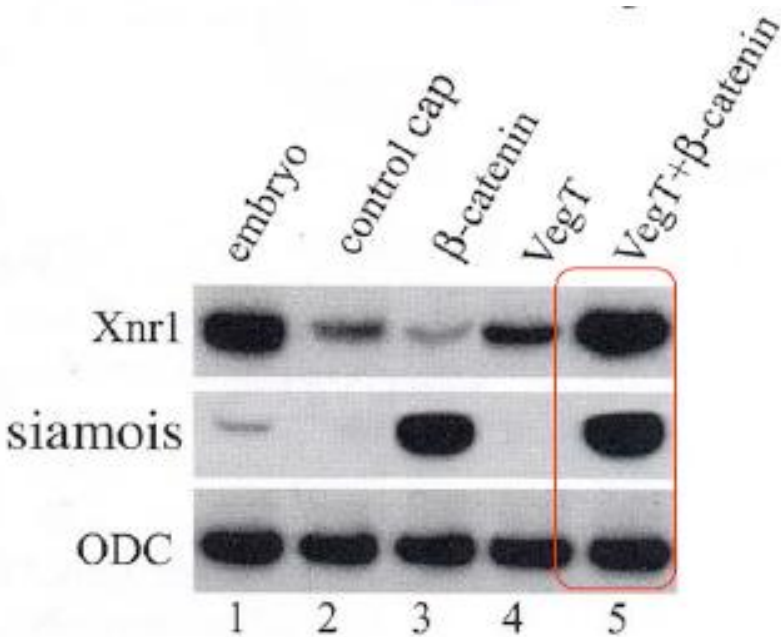
rôle de la voie Wnt / beta-caténine ?



+/- RNA β-Catéine
VegT

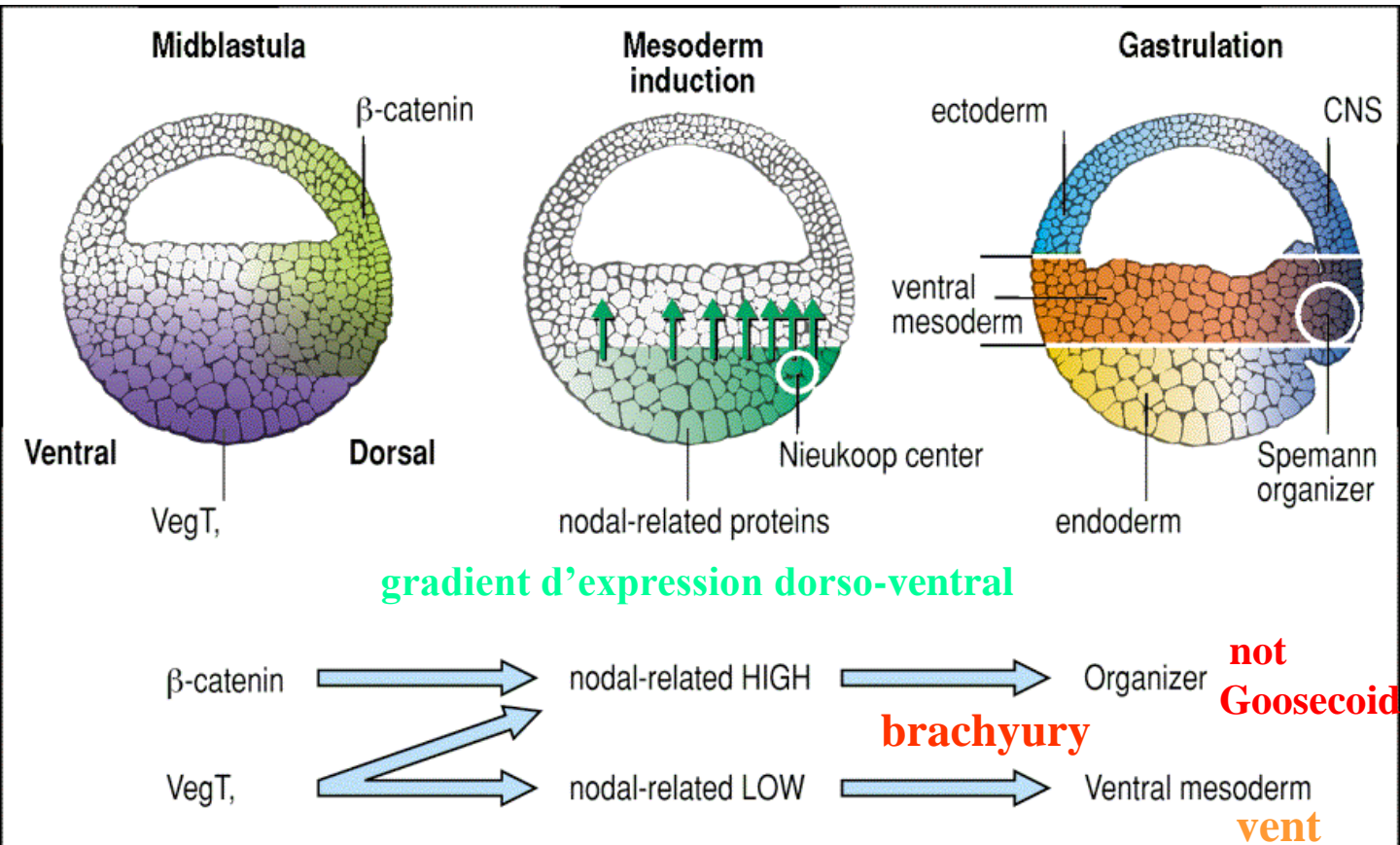


RT-PCR



Le gradient d'expression des gènes nodal serait du à l'action synergique de **VegT** et de **β catenin** (Aizawa et al., 2000)

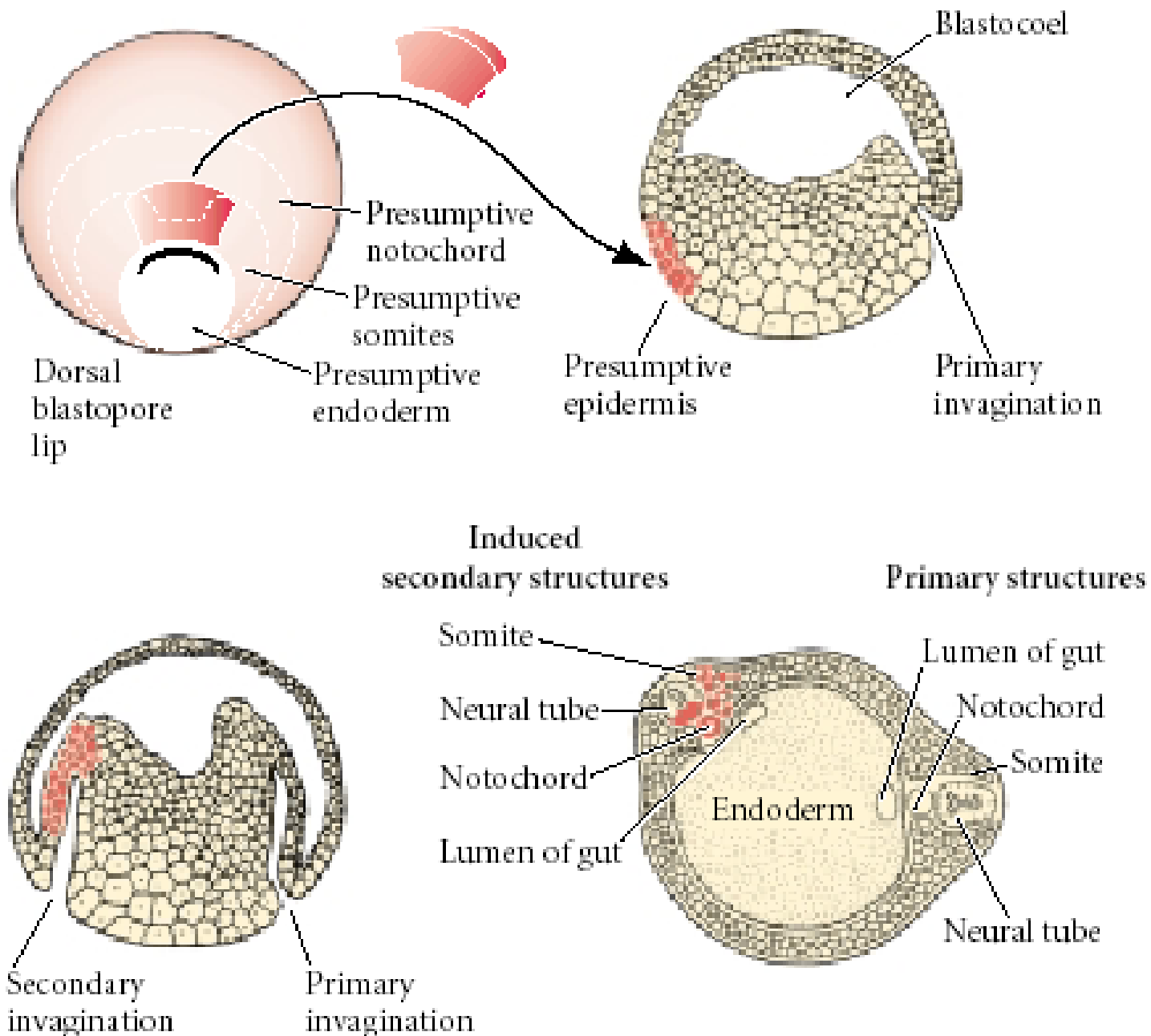
Modèle de l'induction du mésoderme ... et du centre de Spemann



Centre de Spemann :

- tissu déterminé à générer le mésoderme dorsal : notochorde et la plaque préchordale (via l'expression de Facteurs Transcriptionnels : facteurs *Goosecoid* et *not* (fact. À homéodomaine))
- tissu capable d'induire un deuxième axe et à réorganiser les tissus avoisinants ...

L'expérience de Spemann et Mangold (1928)



→ Le mésoderme dorsal (centre de Spemann)

- est déterminé
- modifie le destin des tissus avoisinants par la sécrétion de facteurs de signalisation (signal 3)

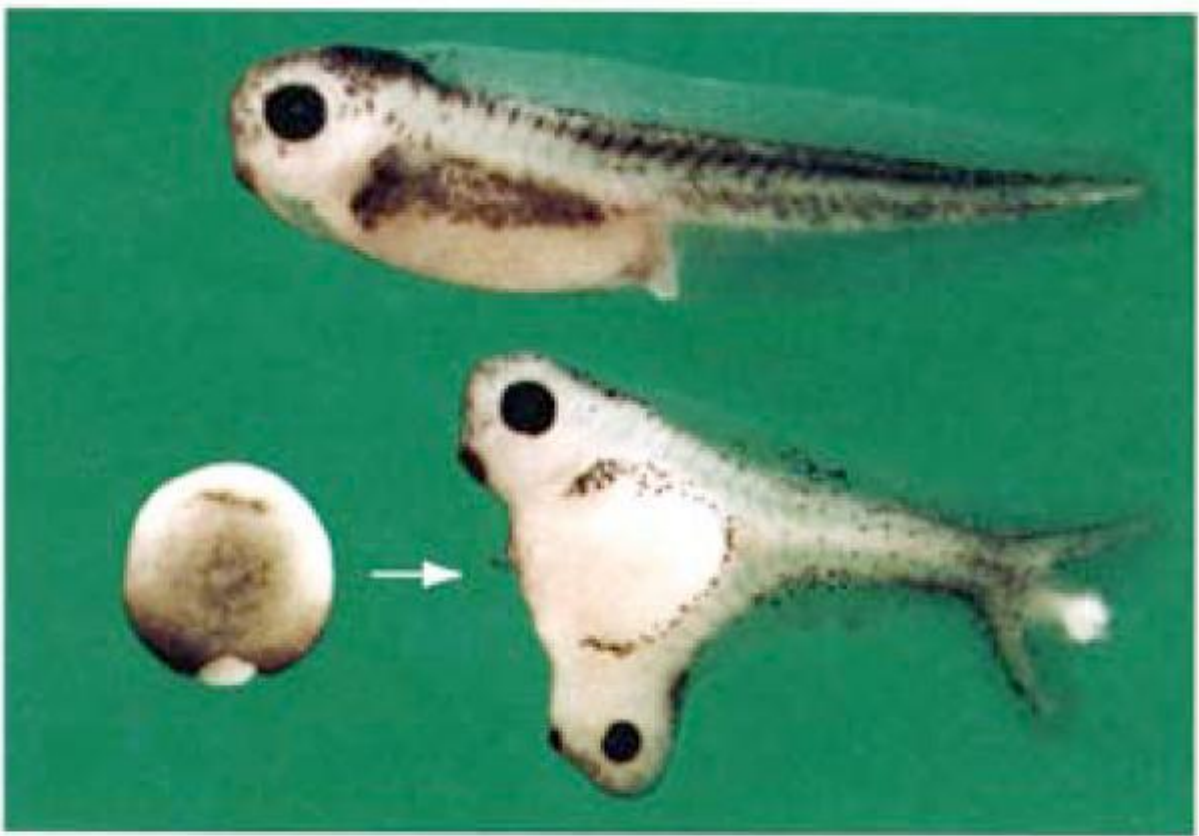


Figure 1 The Spemann-Mangold organizer experiment repeated in *Xenopus laevis*. (Top) control swimming tadpole; (bottom-right) Spemann organizer graft at the same stage. In the bottom-left embryo the size of the graft can be visualized as a white patch (Spemann organizer from an albino donor embryo) at early gastrula (vegetal view). The dorsal lip of the blastopore may be seen as a thin crescent opposite the graft.

→ L'organisateur de Spemann :

- Acquiert le mouvement d'involution (autonome)
- Génère le mésoderme dorsal
(notochoorde + plaque préchordale)
- Modifie les tissus adjacents (forme un 2ième axe)

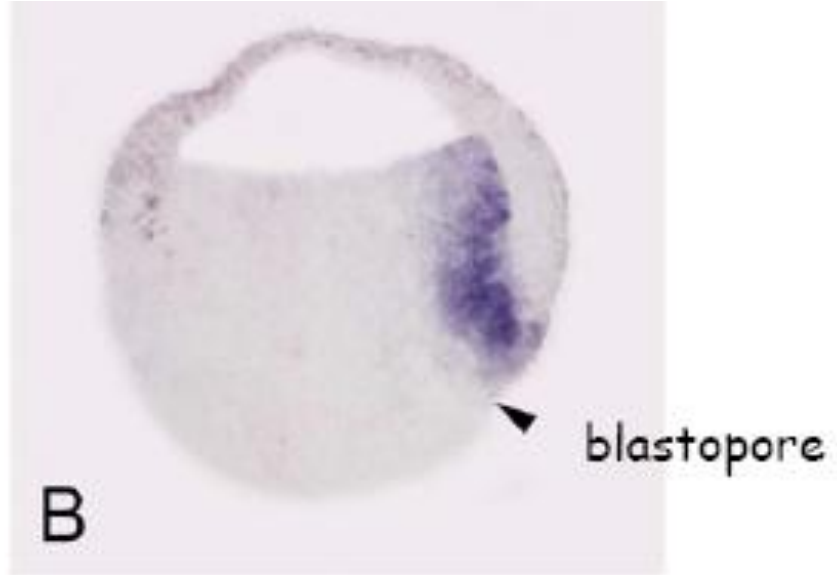
→ Mécanismes impliqués ???

- quels sont les facteurs donnant ces propriétés
- quels sont les facteurs sécrétés par ce centre
(recherche internationale 1960 → 1970)

Rôle du facteur Goosecoid dans l'organisateur (1991)

Molecular Nature of Spemann's Organizer: the Role of the Xenopus Homeobox Gene *goosecoid*

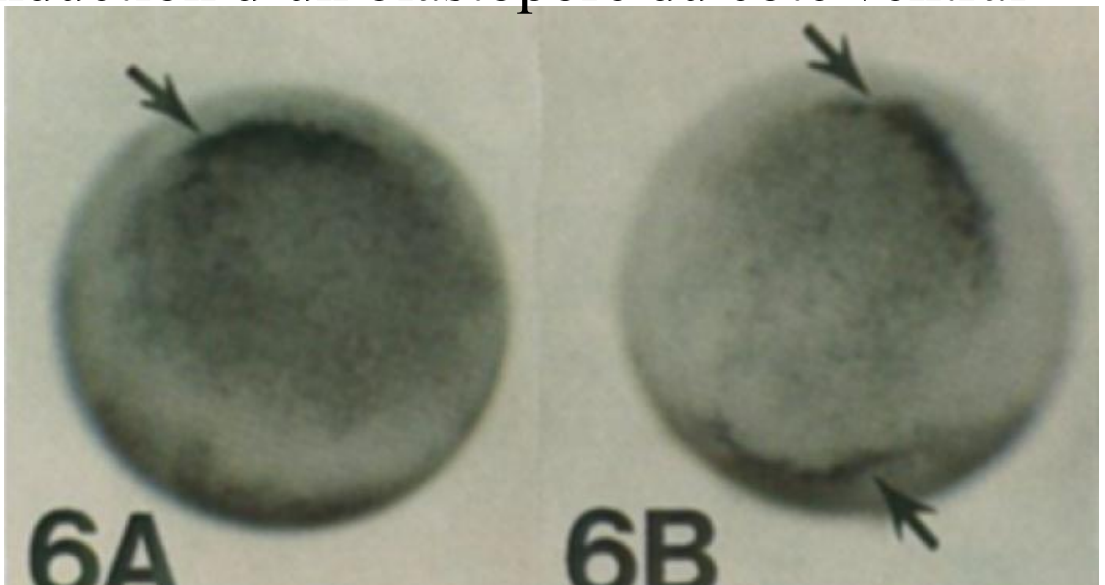
Expression dans le
centre de Spemann :



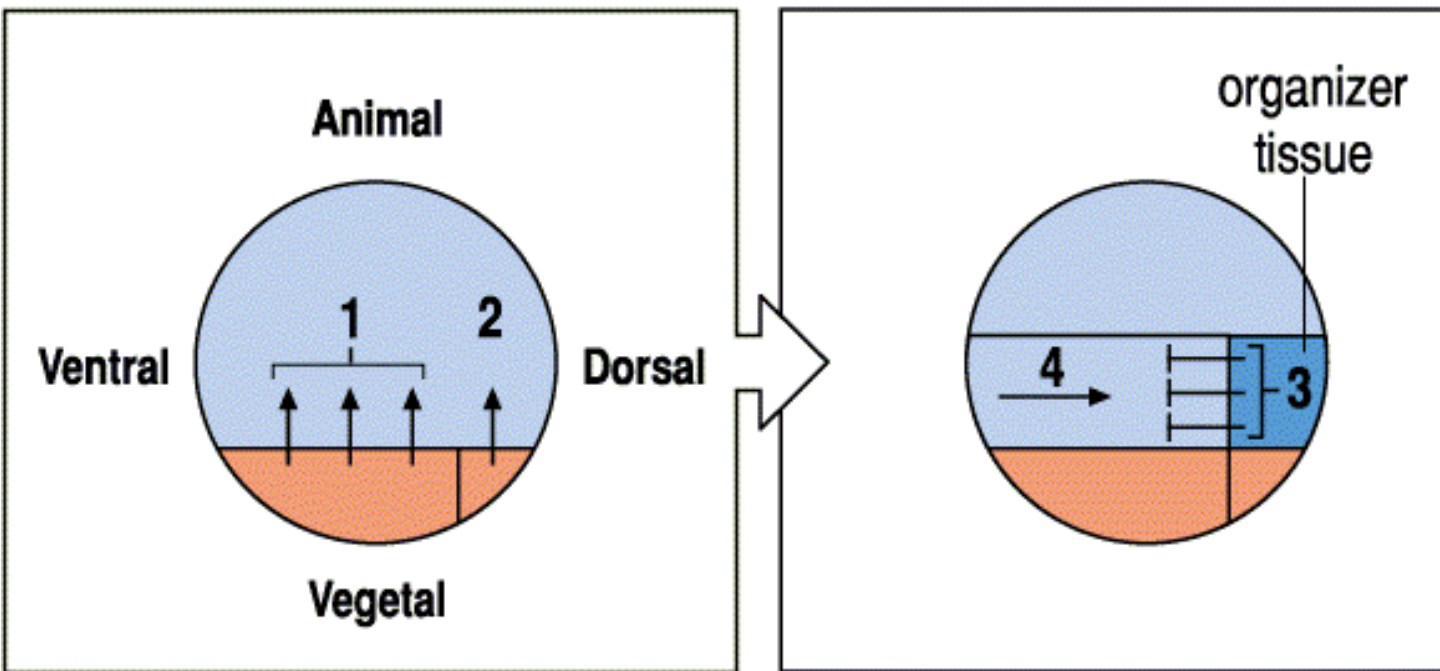
Section de gastrula précoce montrant
l'expression du gène *goosecoid*
restreinte à la région organisatrice.

Expression ectopique du côté ventral

→ induction d'un blastopore du côté ventral



Recherche des facteurs de signalisation émis par le centre de Spemann



Centre de Spemann émet un signal 3 bloquant un signal émis du côté ventral

Identification des facteurs extracellulaires

(1992 → 2002)

- **Chordin**

- **Noggin**

- **Follistatin**

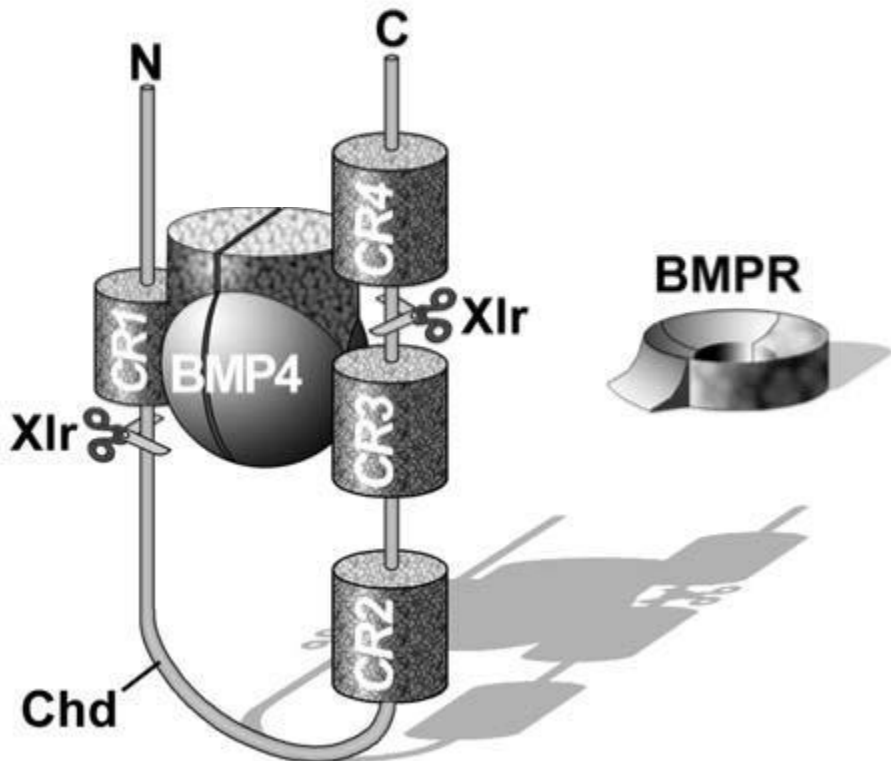
: **Antagonistes de BMP** (signal 4)
(BMP4, BMP2 et BMP7)

Liaison de Chordin (Chd) à BMP4

a



b



(protéines extracellulaires)

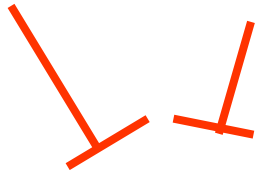
La voie de transduction des

Follistatin

TGFbeta et les antagonistes

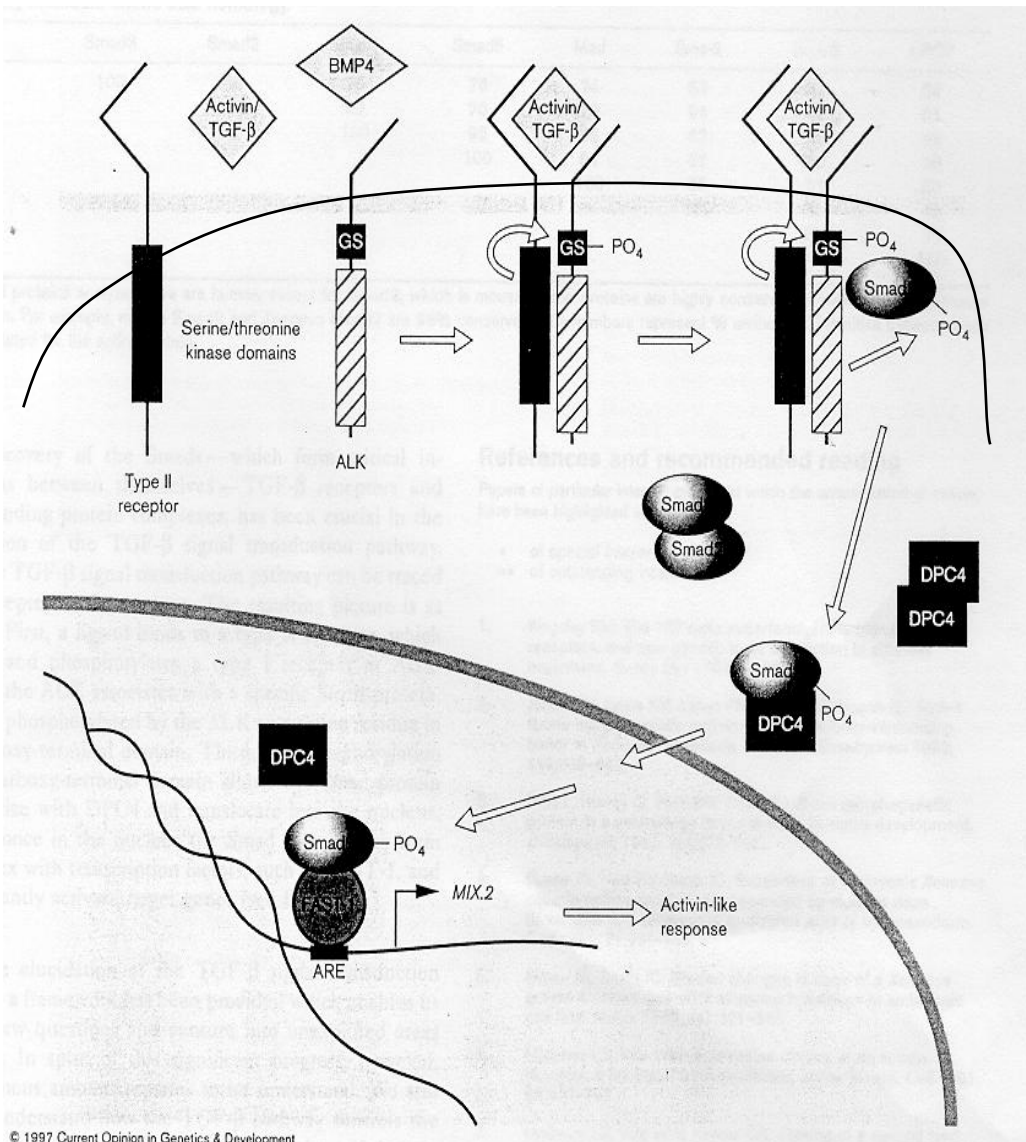
Noggin

Chordin

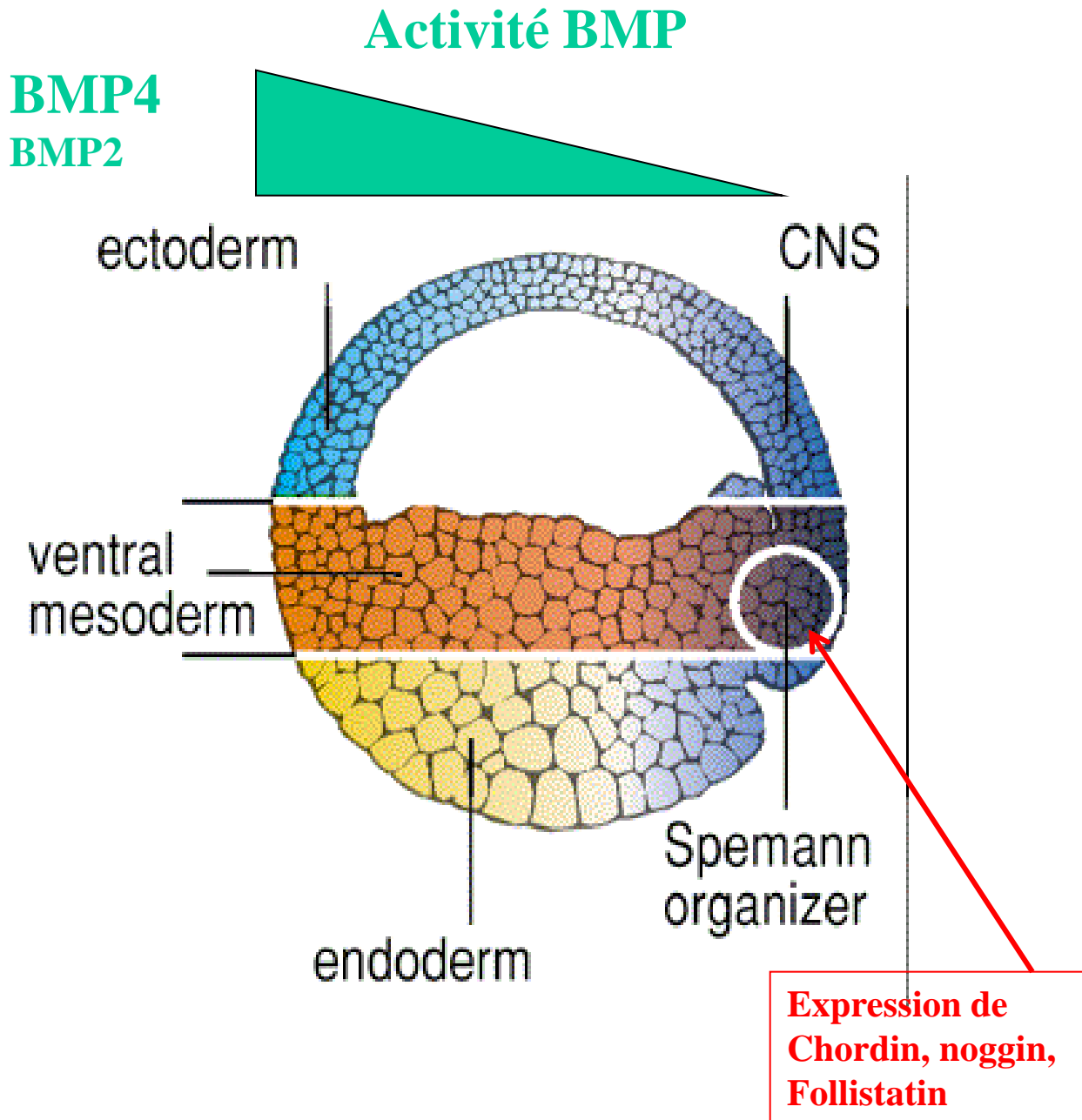


Famille TGFbeta :

- TGFbeta
- BMP + noggin, chordin
- activeine
- Nodal

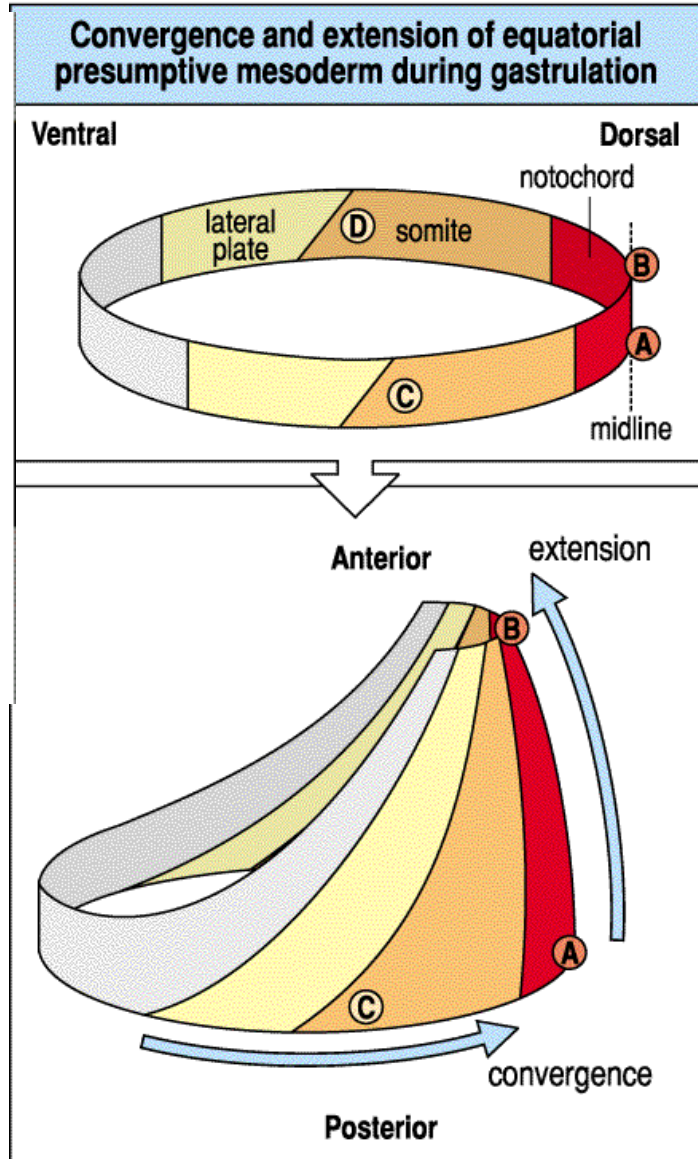
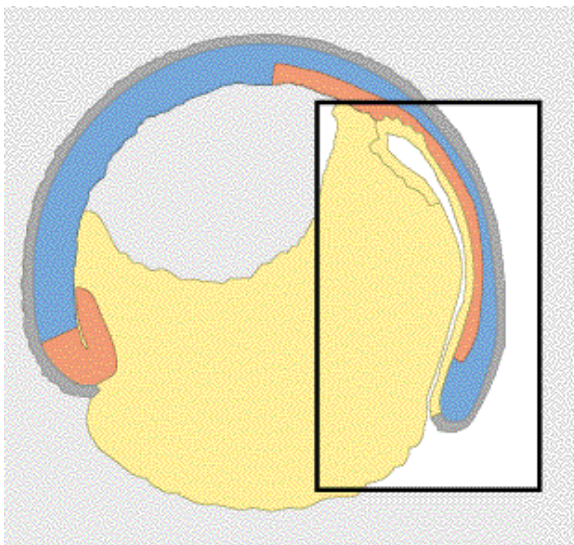
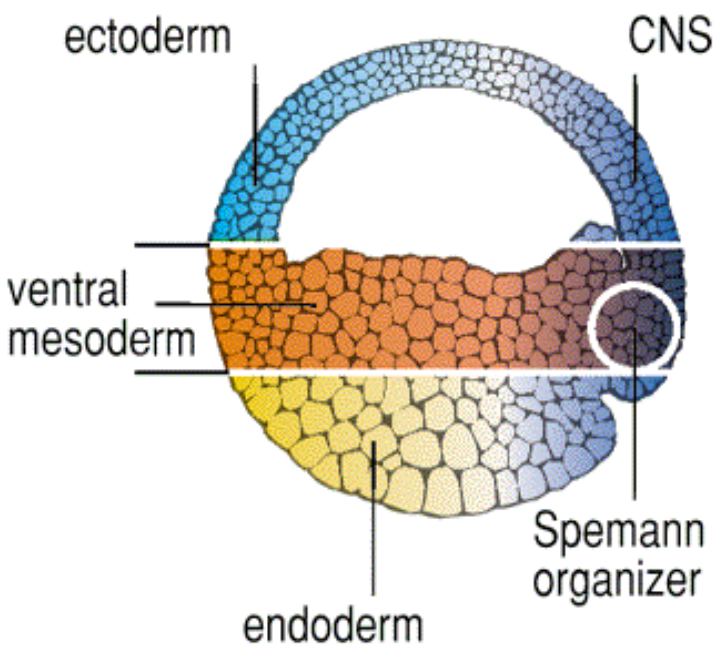
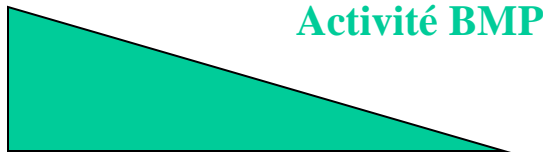


Remodelage des tissus suivant le gradient d'activité BMP



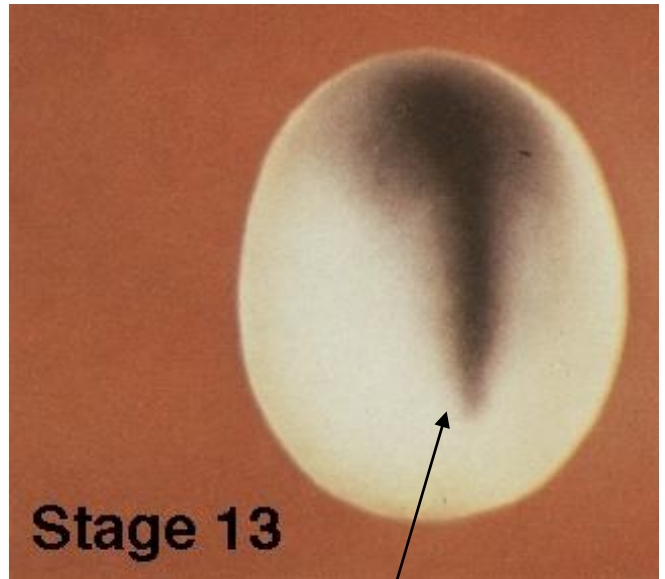
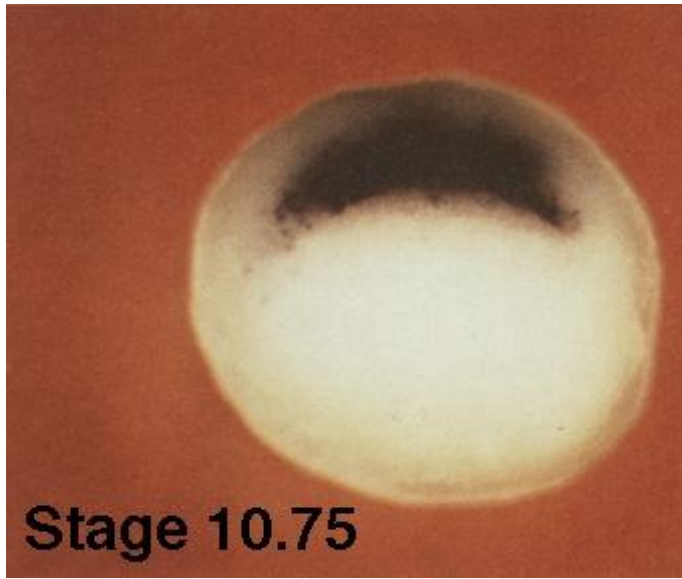
- Le gradient d'activité BMP détermine le type
- de tissu mésodermique (axial, paraxial et ventral)
 - De tissu ectodermique (CNS ou épiderme)

Remodellage du mésoderme suivant le gradient d'activité BMP



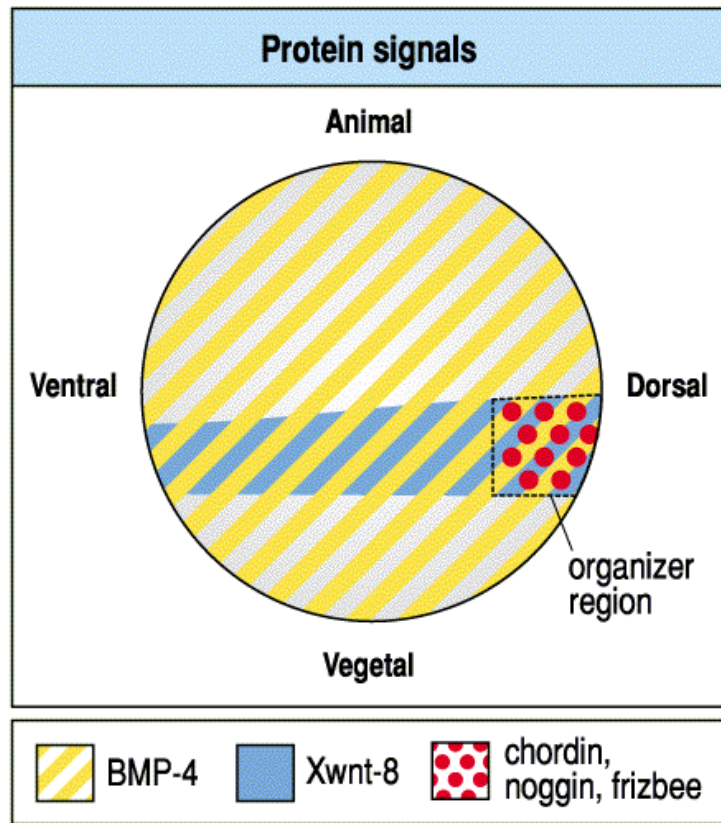
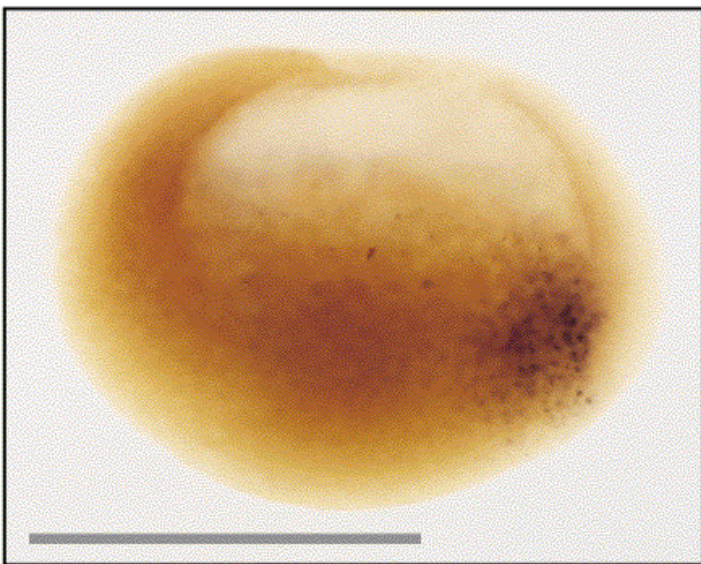
→ Le gradient d'activité BMP explique la carte de destin

Expression de Chordin (HIS)

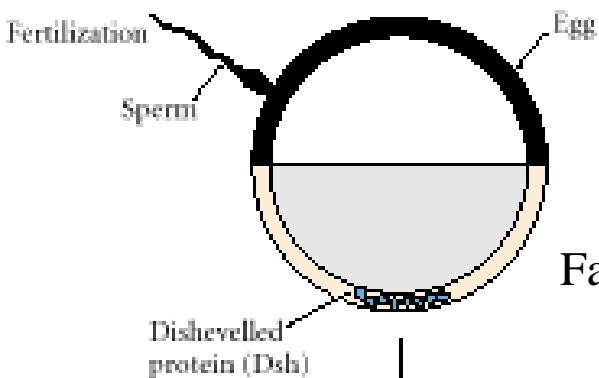


(Notochorde en formation)

Expression de Noggin

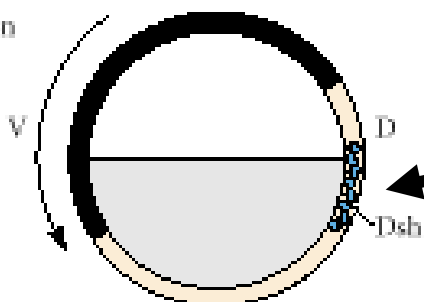


Résumé de la gastrulation Chez le xénope.



Facteurs maternels : ARNm Vg1, VegT
protéine Dishevelled

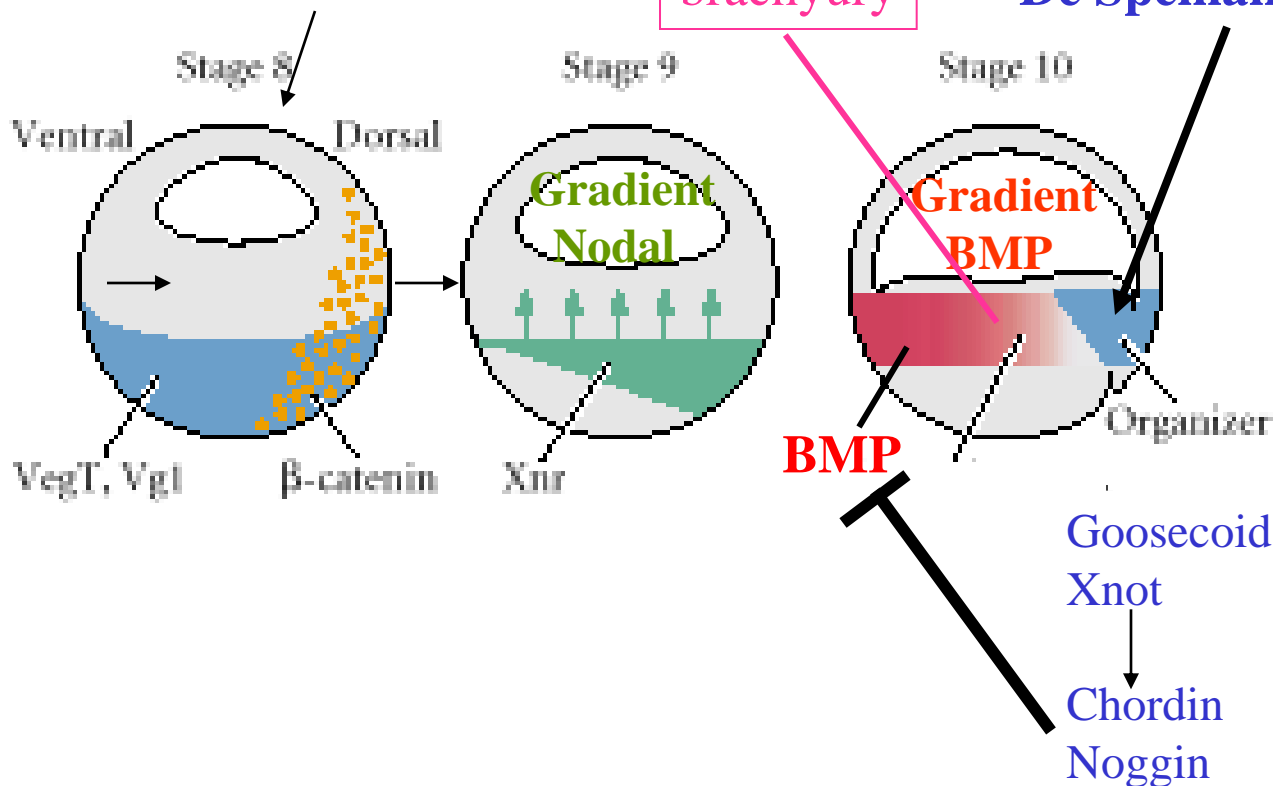
Cortical rotation



Centre de Nieuwkoop

Organisateur De Spemann

brachyury



Test de la fonction des gènes par :

- Injection d'ARNm (gain de fonction)

- Injection de morpholino antisens (perte de fonction)

(→ applicable surtout aux premiers stade de développement : 3jours)