

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 premiers étapes menant au stade phylotypique

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

Le zebrafish ou poisson-zèbre : gènes et facteurs régulateurs

Partie 3 : L'organogenèse

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

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

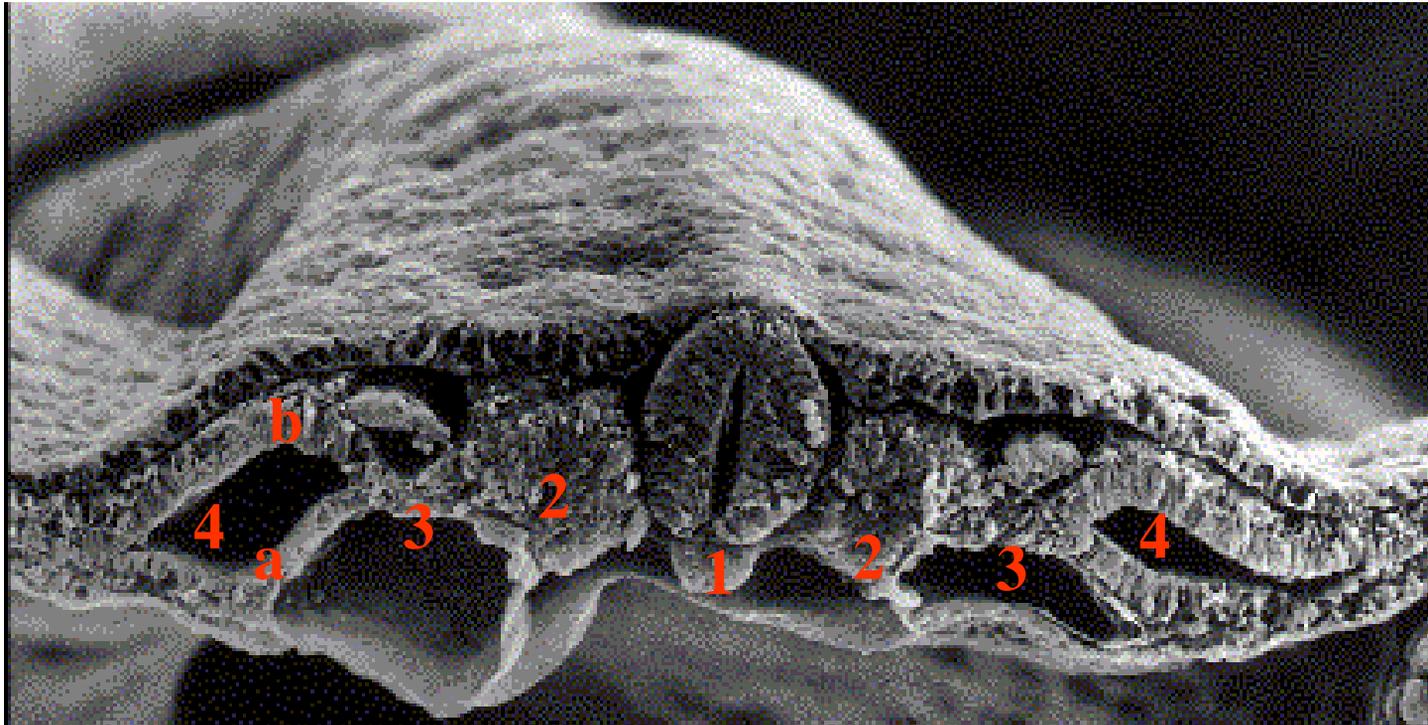
Formation et remodelage de l'endoderme; développement du pancreas.

Le remodelage du mésoderme

(« Mesoderm patterning »)

Subdivisions selon la localisation médio-latérale :

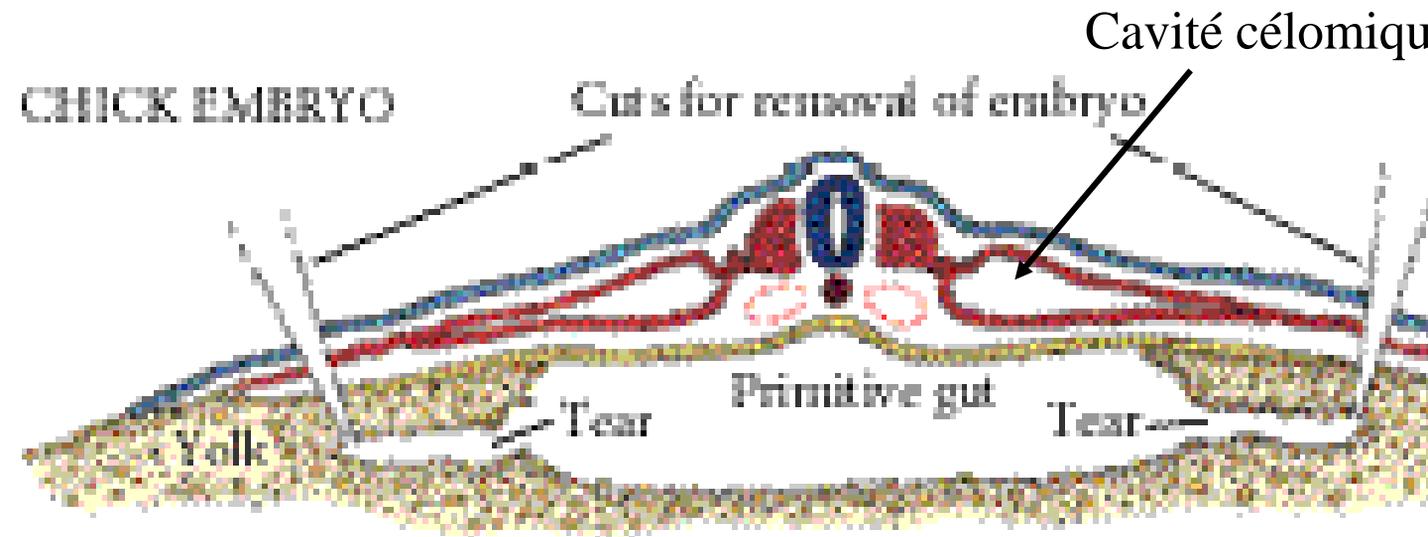
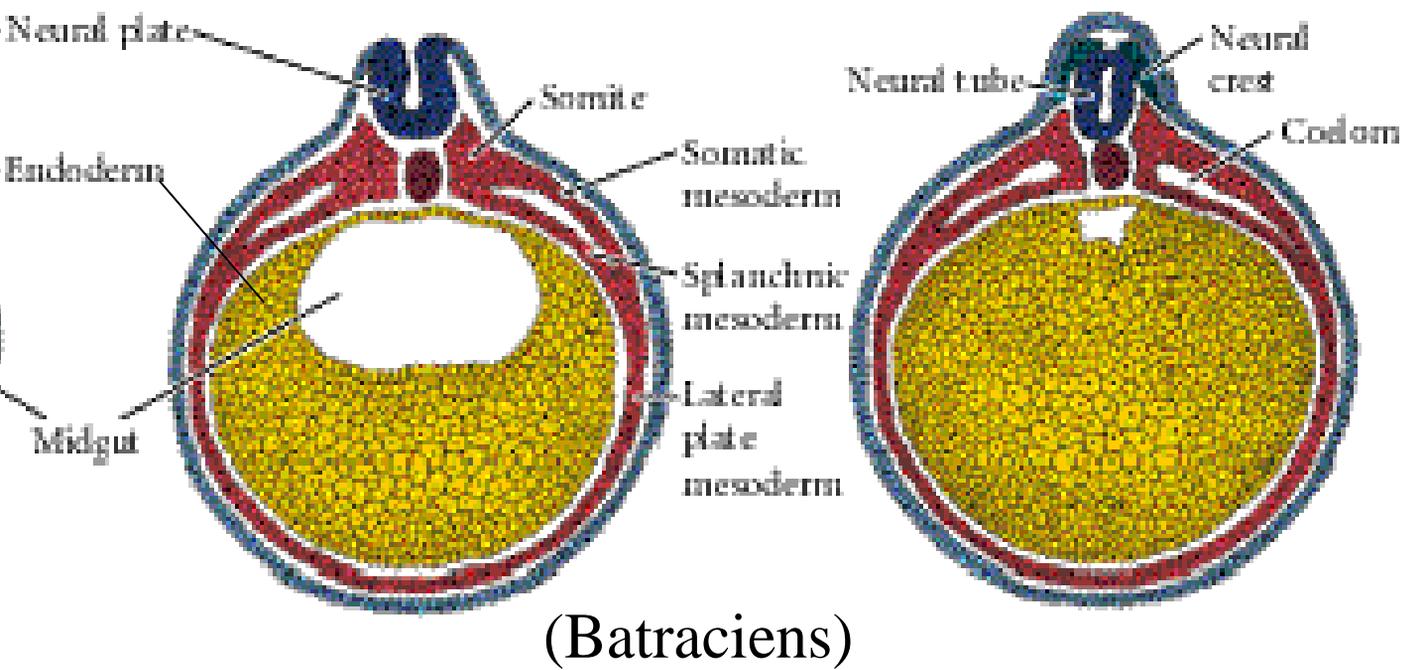
- 1) Mésoderme **axial** : notochorde + plaque préchordale
- 2) Mésoderme **paraxial** : somites (muscles sq. , vertèbres, .)
- 3) Mésoderme **intermédiaire** (gonades, rein, ...)
- 4) Mésoderme **latéral** : a) splanchnique (vaisseaux, sang, cœur, muscles lisses du tube dig. ...)
b) somatique (membres, somatopleure ...)



(embryon de poulet au stade phylotypique)

(forte similarité chez tous les vertébrés
dans de remodelage du mésoderme)

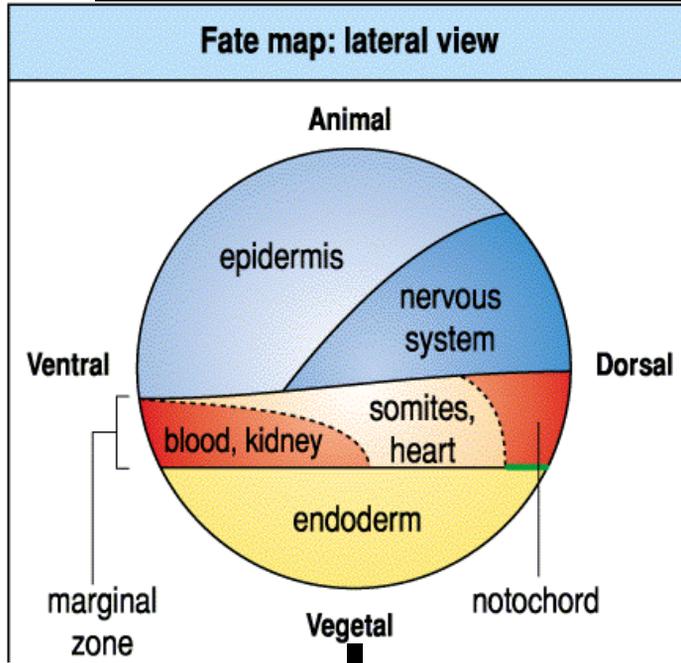
Disposition similaire chez tous les vertébrés (Etape phylotypique)



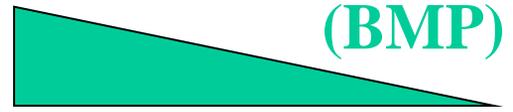
(Oiseaux)

(... et poissons)

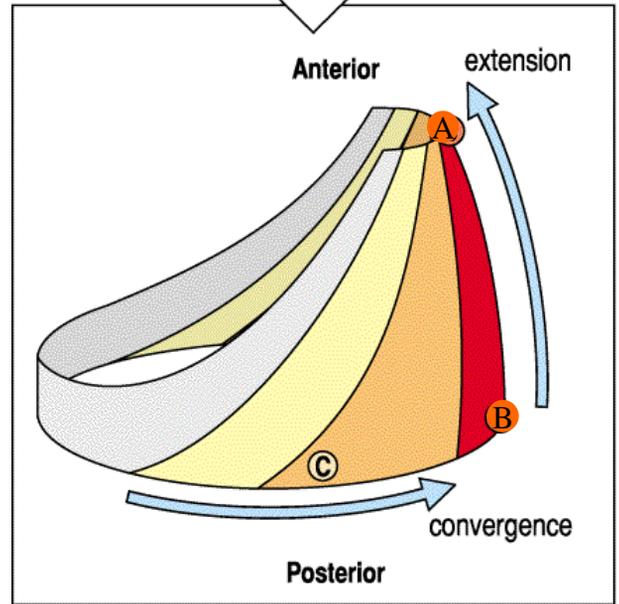
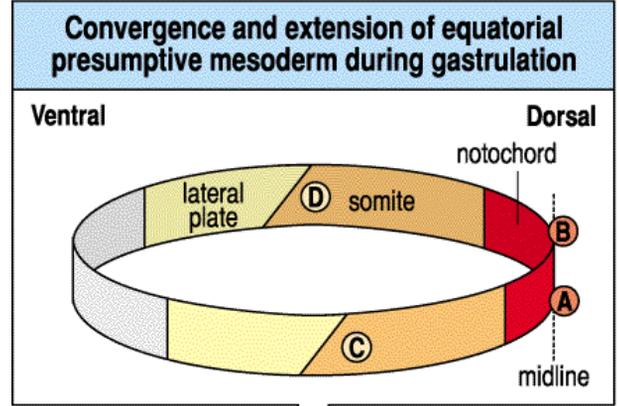
Relocalisation du mésoderme durant la gastrulation



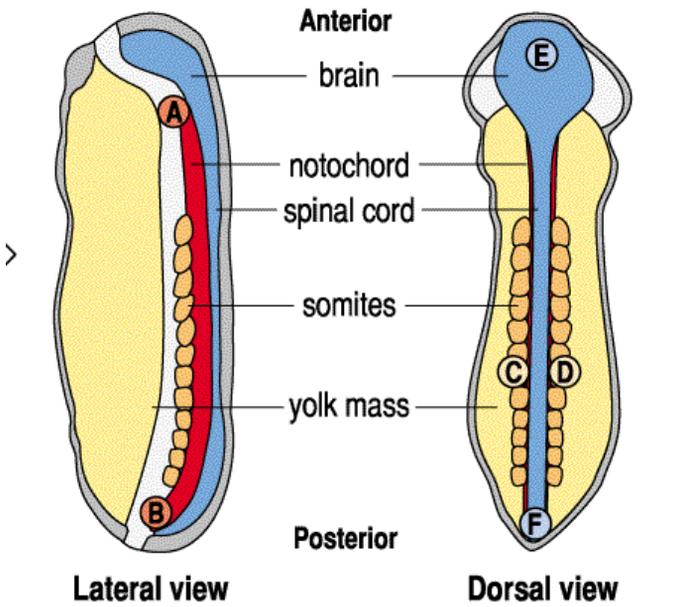
(chez le xénope)



Mésoderme avant gastrulation



Sections of tailbud stage *Xenopus*



Mésoderme après gastrulation

fin blastula

(BMP)

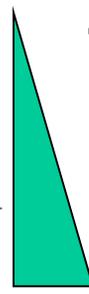
stade phylotypique

Mésoderme dorsal

dorso- latéral

ventro- latéral

ventral



mésoderme axial

paraxial

intermédiaire

latéral

Expression de Chordin durant la gastrulation

(BMP)




Antérieur

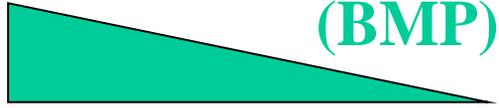


Postérieur

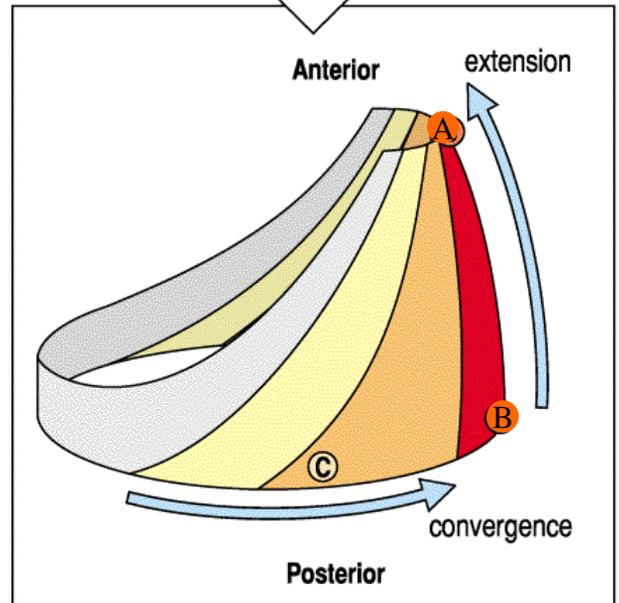
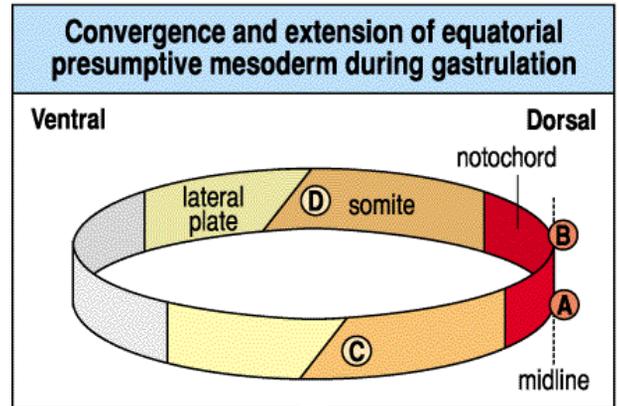
(BMP)



(BMP)

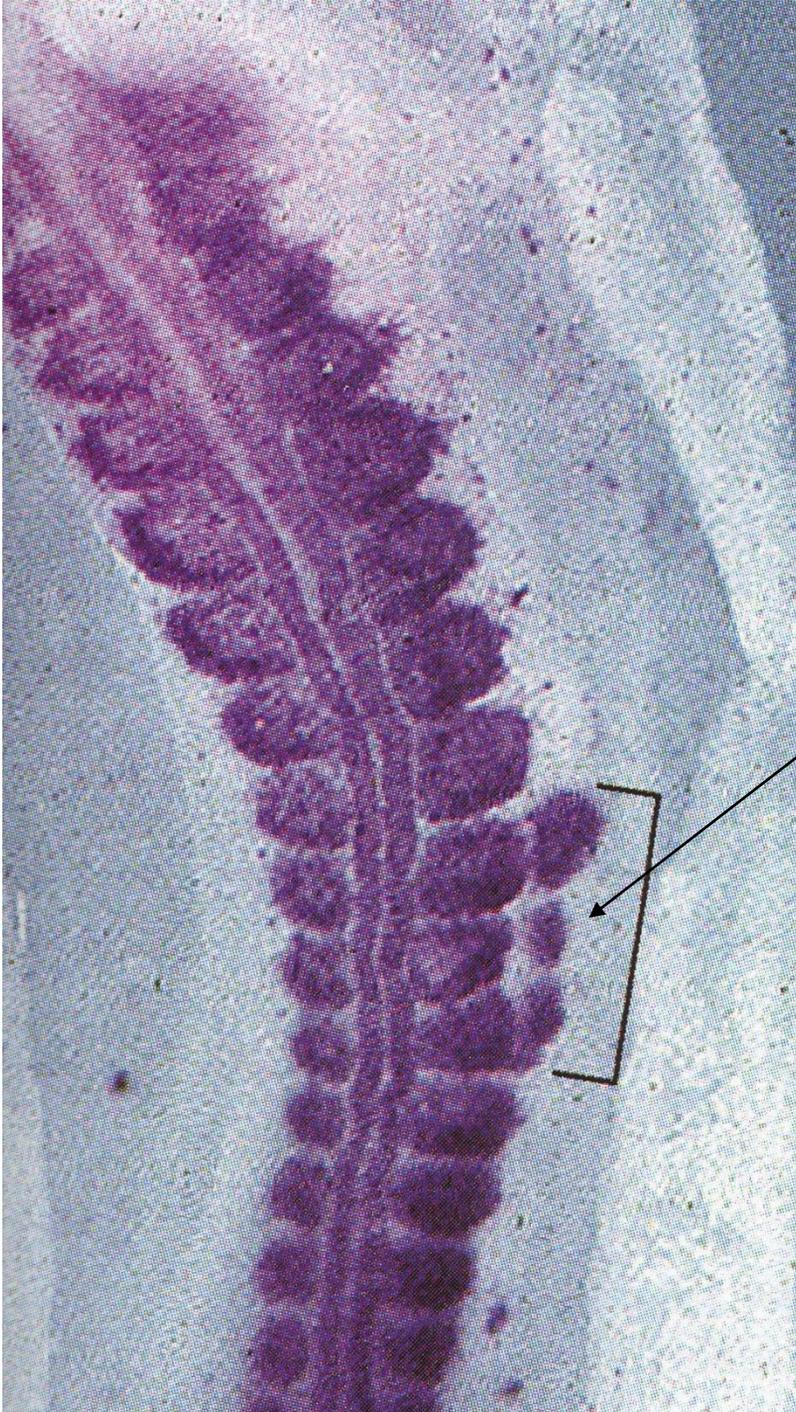


Mésoderme avant gastrulation



Mésoderme après gastrulation

Modification du gradient BMP → Modification du remodelage du mésoderme



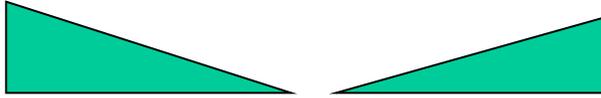
implant de cellules
secrétant noggin
(antagoniste de
BMP)

→ Transformation
du mésoderme
intermédiaire en
paraxial (somites)

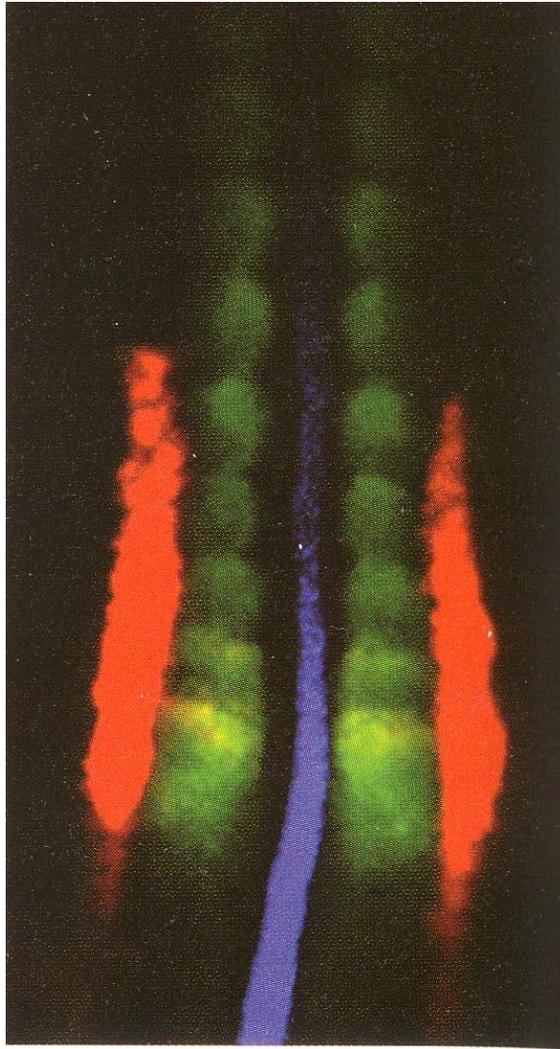


(gradient BMP)

Activation de facteurs transcriptionnels en fonction du gradient BMP



(gradient BMP)



HIS (hybridation in situ) à triple marquage

Foxa2

Not /Flh (floating head mutant)

Foxc1

Foxc2

Pax2 (mutation → syndrome anomalies des reins)

(Les différents mésoderme sont affectés dans les souris KO pour ces gènes régulateurs)

La segmentation du mésoderme paraxial

- somites (nombre variable pour chaque espèce)
- segmentation progressive dans le sens antéro-postérieur
- 2 à 3 paires de somites /heure chez le zebrafish.
- 90 min par somite chez le poulet et la souris
- repère du stade de développement.

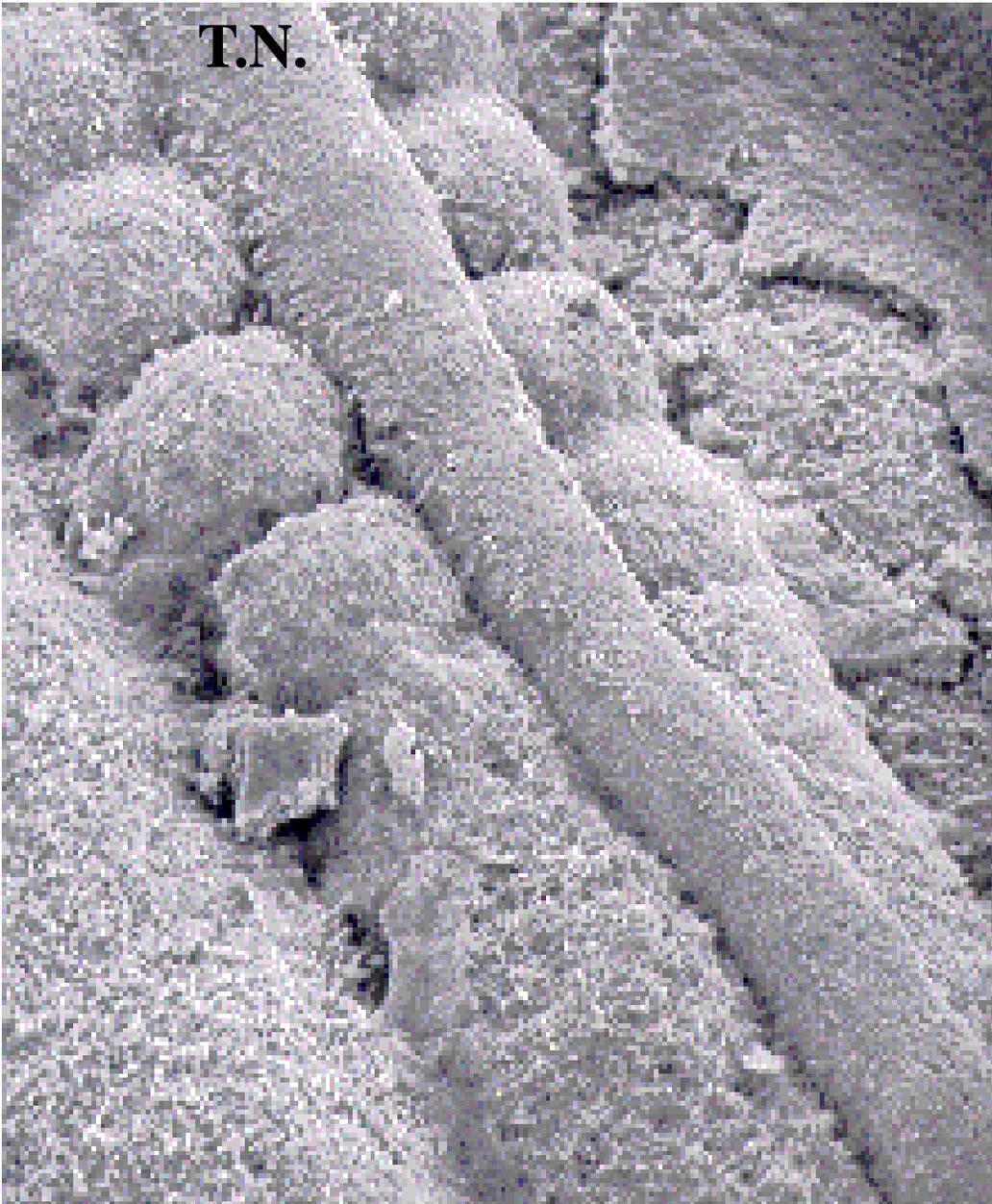
Partie antérieure

T.N.

Somites
(mésoderme
somitique)

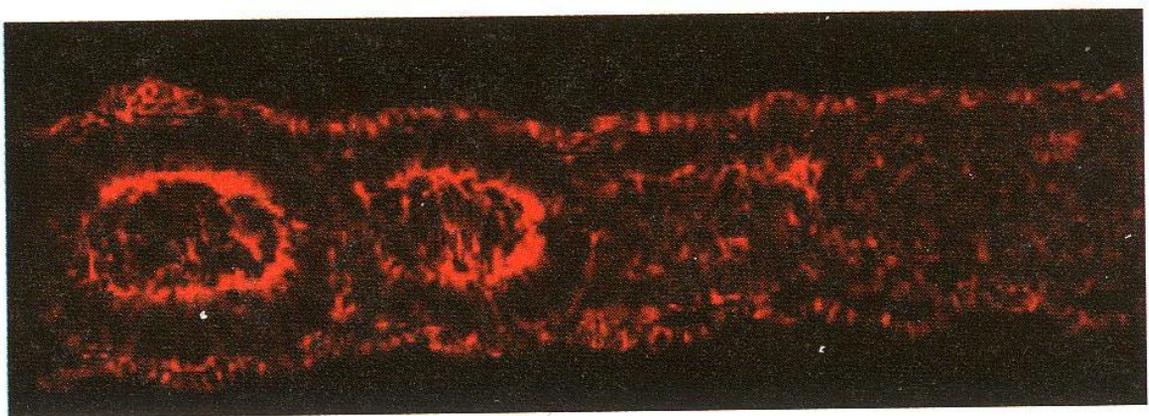
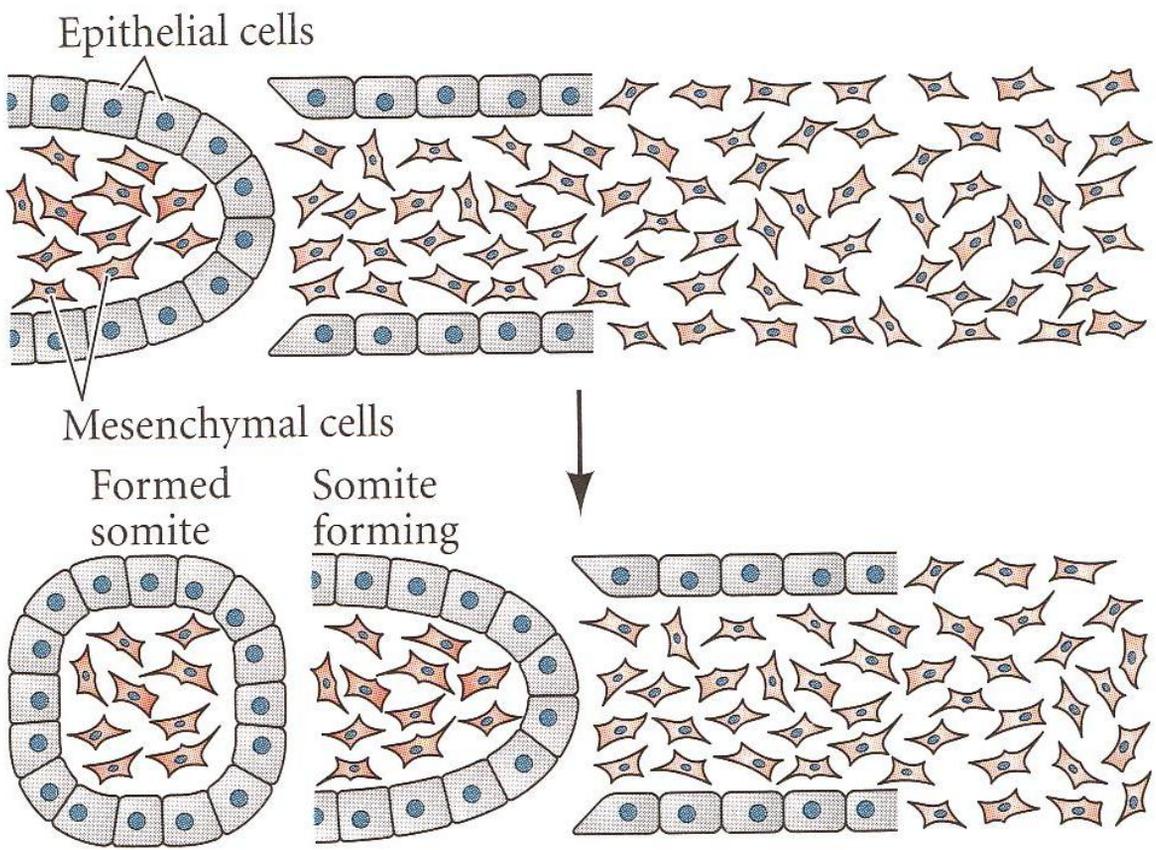
Plaque de
Segmentation
(mésoderme
présomitique)

Partie postérieure



Mécanisme de la segmentation

Transition mésenchyme – épithélium



F-actin

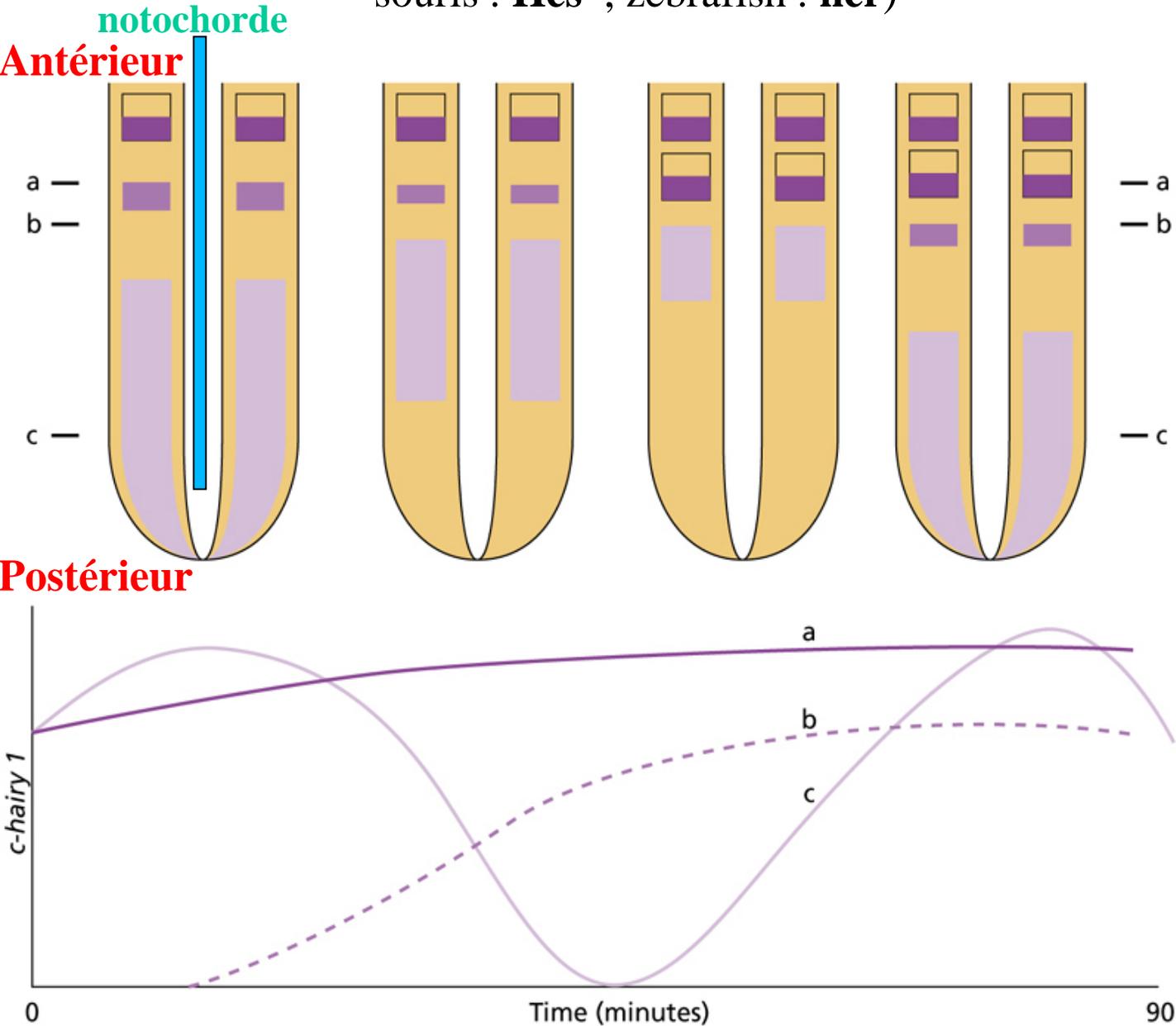
- Par expression - de E-cadérines, F-actin (polarisation)
- d'intégrine, fibronectine
- de ephrines et récepteurs Eph
(→ répulsion)

Facteurs moléculaires impliqués dans la segmentation

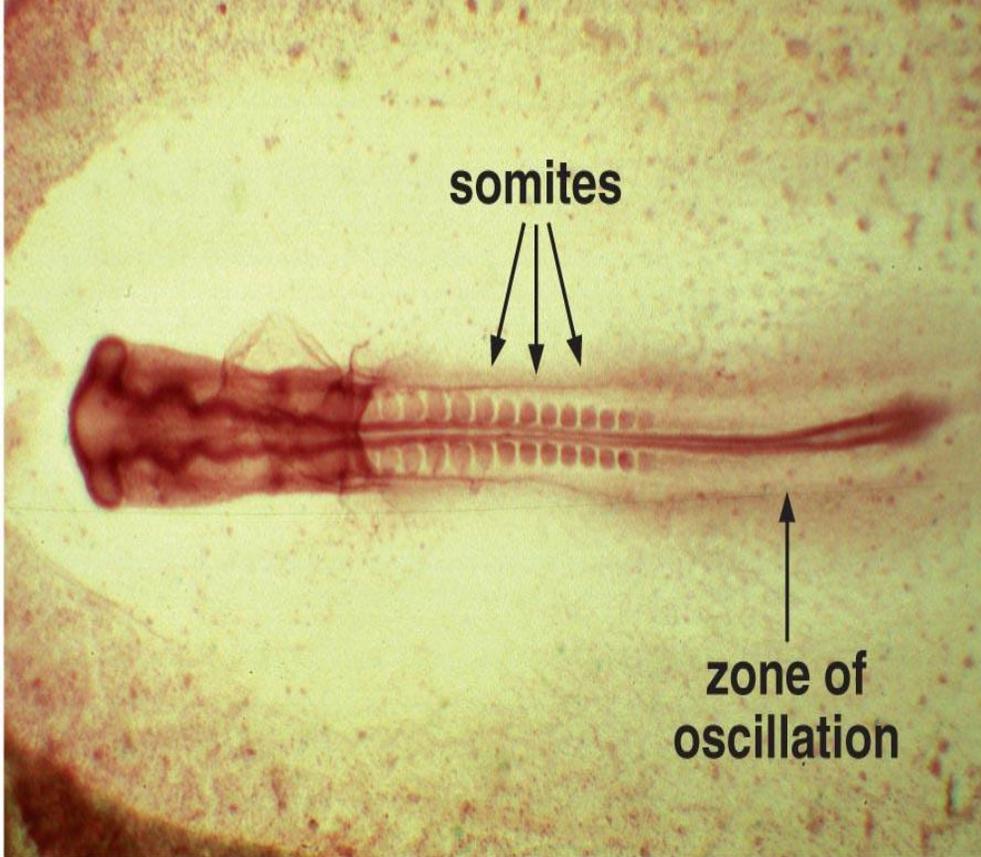
(Le mécanisme exact n'est pas encore connu)

Facteur transcriptionnel **Hairy1** : Oscillateur moléculaire

Profil d'expression dynamique : « vagues » d'expression
(orthologues chez drosophile, xenope et poulet : **Hairy**
souris : **Hes** , zebrafish : **her**)

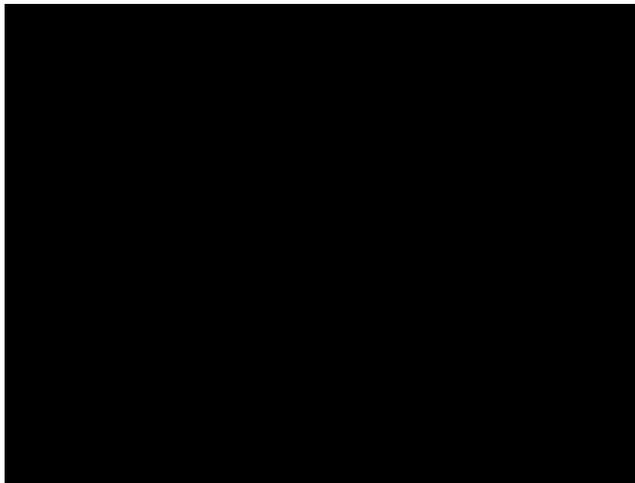


→ Hairy1 est exprimé dans la partie postérieure de la somite (poulet)



Formation :
-Rythmée
-Séquentielle

Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.



Voir : [http://www.cell.com/supplemental/S0092-8674\(00\)80451-1](http://www.cell.com/supplemental/S0092-8674(00)80451-1)

1) Expression et rôle des facteurs her

(HIS de her1)



la mutation de her1 et her7 affecte la somitogénèse chez le zebrafish

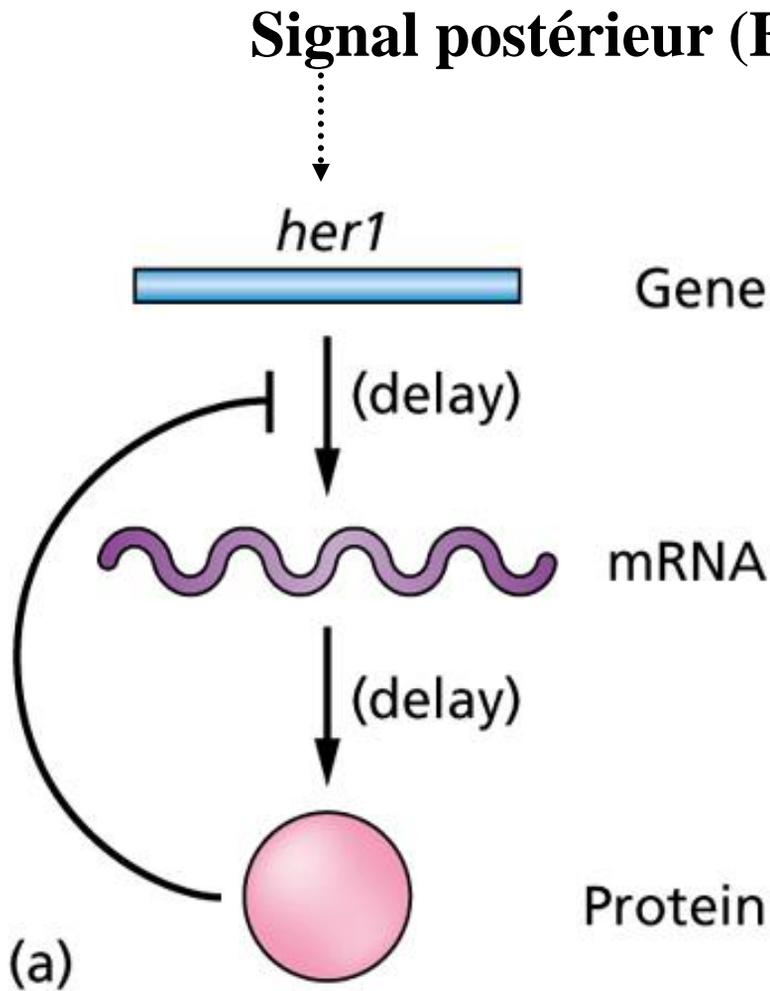
Embryon sauvage



Embryon mutant her1/7

1) Mécanisme de l'oscillation :

un «feed-back » négatif « retardé »

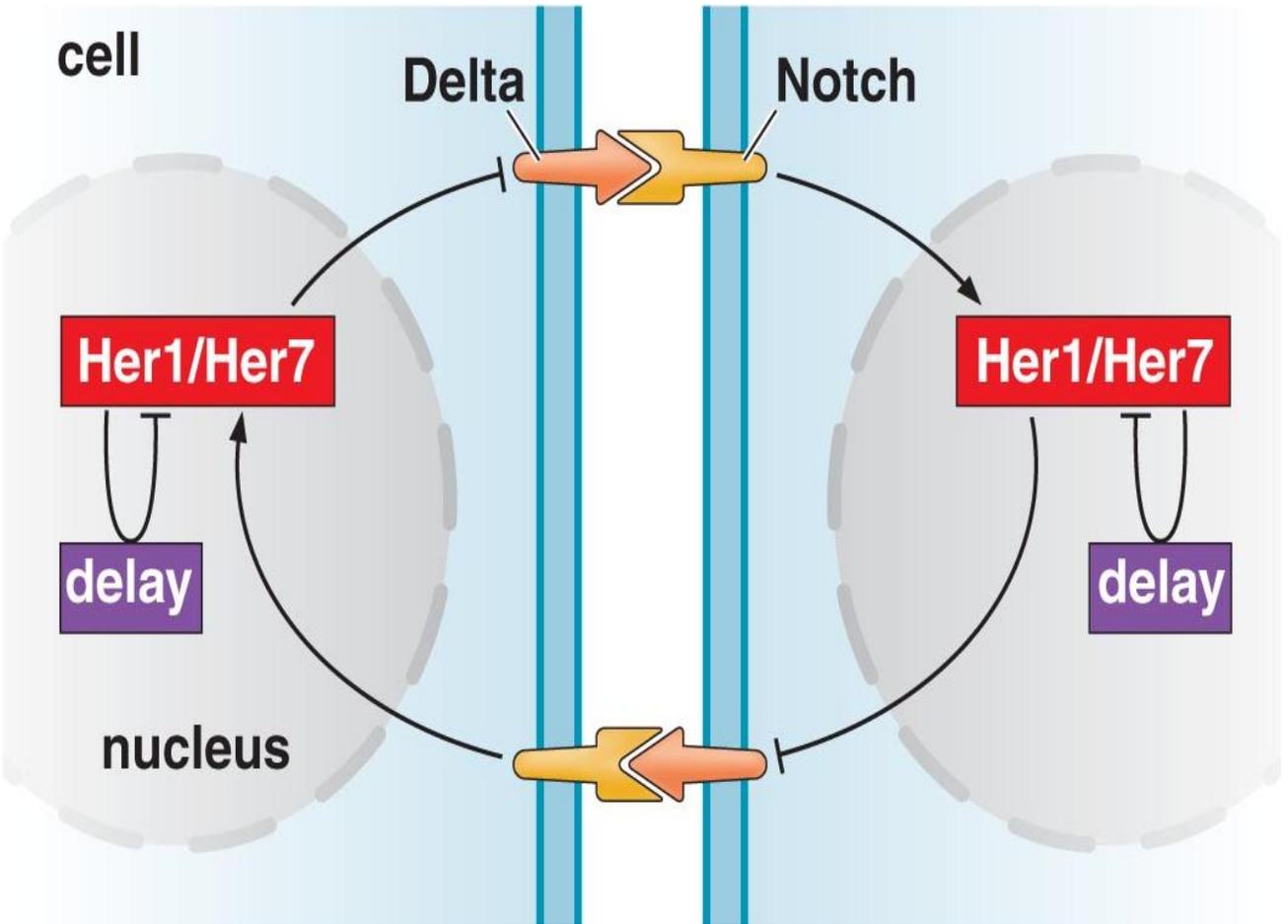


NB : modèle 1 : explication de l'oscillation

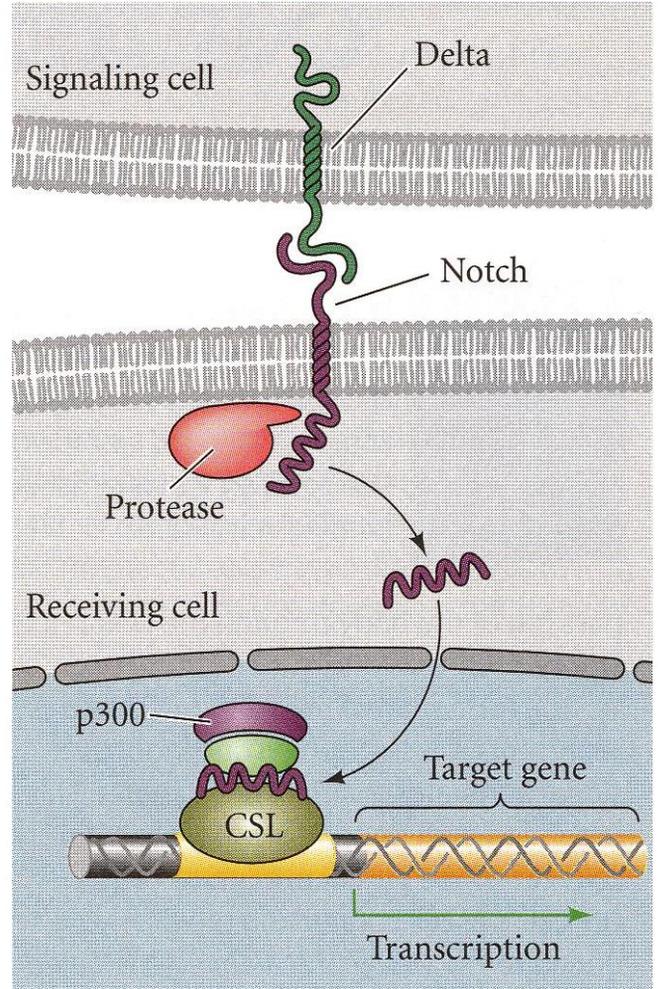
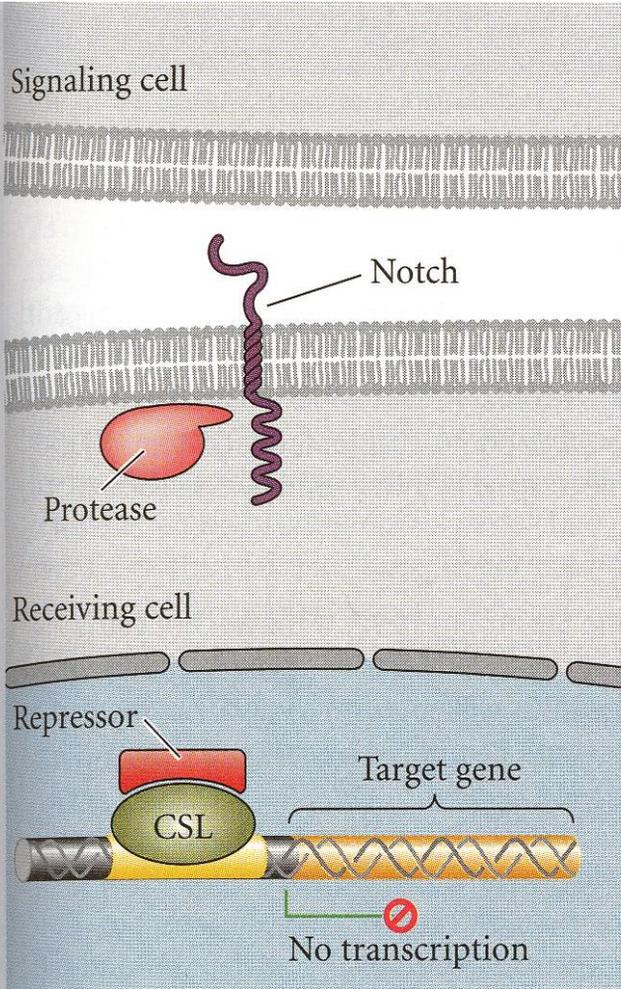
synchronisation des cellules

→ communication entre cellules

→ implication de la voie de signalisation juxtacrine
Delta-Notch

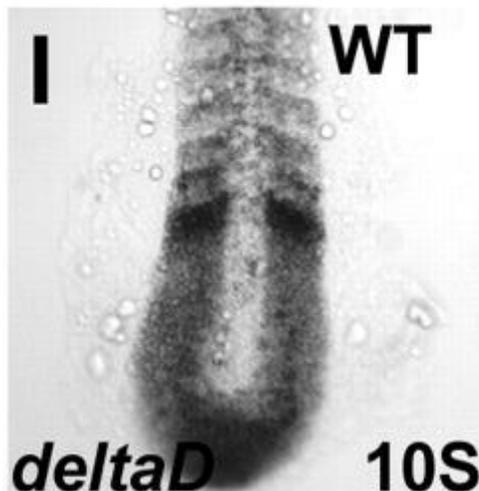


Oscillation de la signalisation Notch → Hairy1



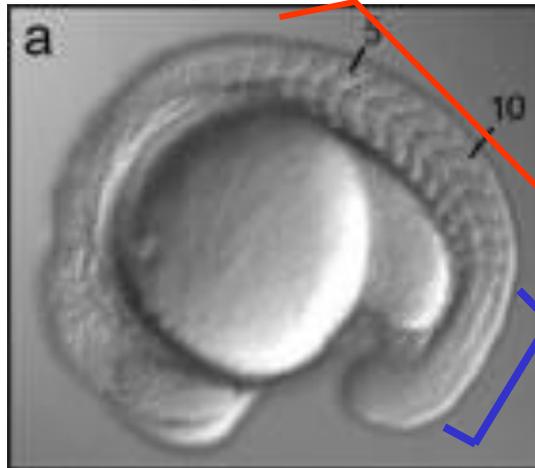
Gène cible : **Hairy1**

Des gènes Delta présentent une expression dynamique // hairy1 et leur mutation bouleverse la segmentation mésoderme paraxial

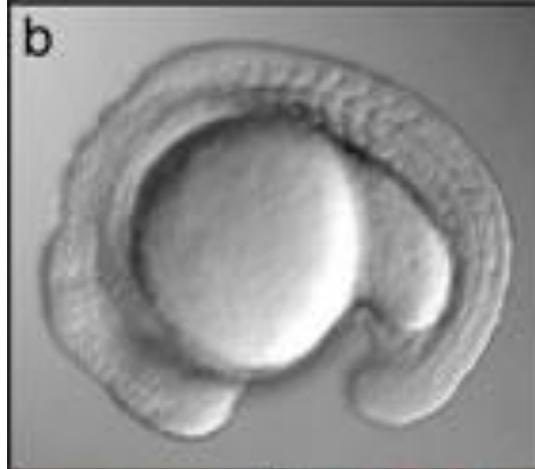


Somites affectées dans les embryons mutés dans le gène Delta C

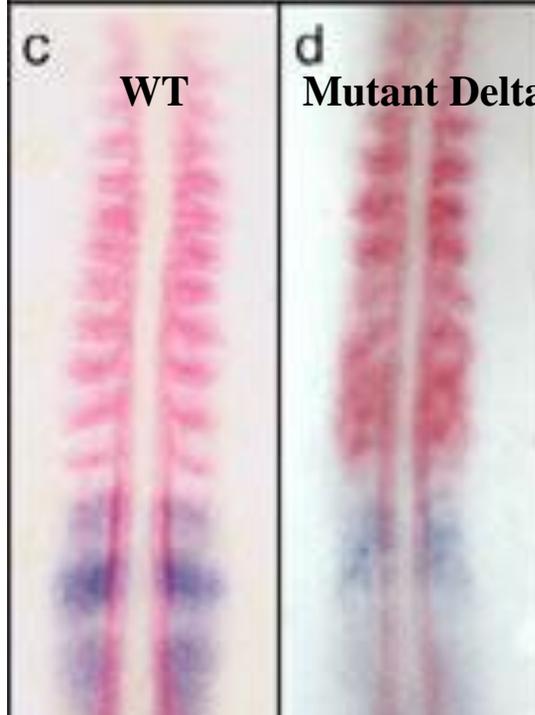
Embryon
Sauvage (WT)



Embryon
Mutant (Delta C)



Hybridation in situ
MyoD (muscles)
Her1 (Hairy1)

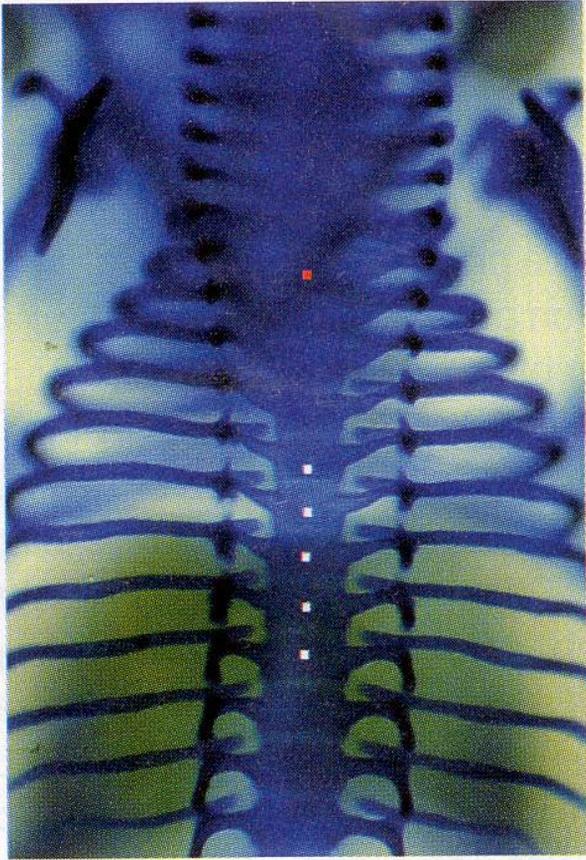


Mésoderme
Somitique

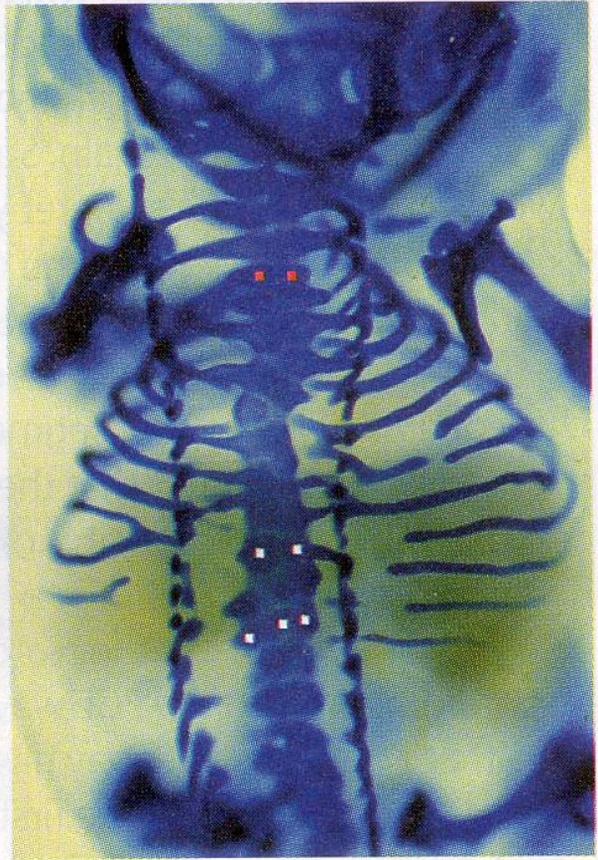
Mésoderme
Pré-somitique

→ La voie delta-Notch est impliquée dans la segmentation

Mutation du gène Delta-like 3 chez la souris (et chez l'homme)



Souris sauvage



mutant Dll-3

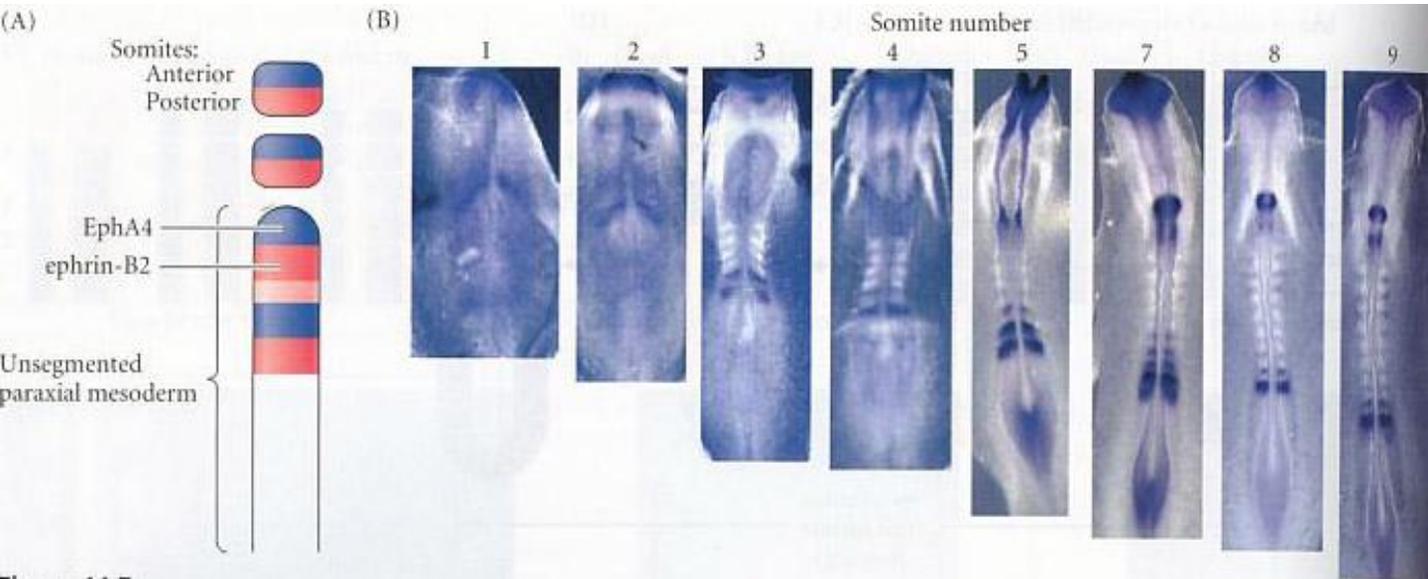
NB: Mutation de *dll3* chez l'homme
→ syndrome de dysplasie spondylo-costale
(malformation des côtes)

Oscillateurs

Notch → Hairy1
(delta)

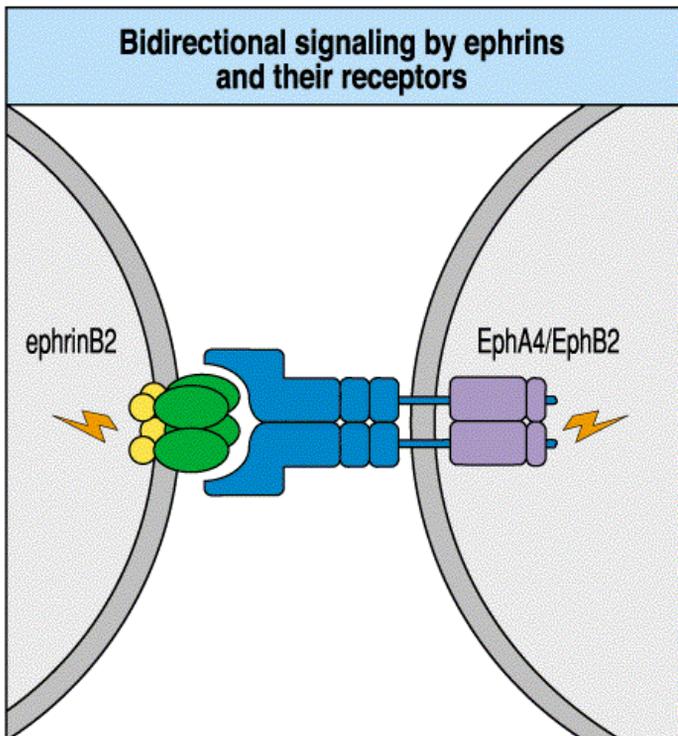
Effecteurs de la segmentation

→ activation ephrine-B2 (→ post.)
→ répression de EphA4 (→ ant.)
→ + autres gènes



Hybridation in situ avec une sonde EphA4

(expression et rôle conservés de Delta, hairy, ephrine et Eph)



ephrinB2 = ligand

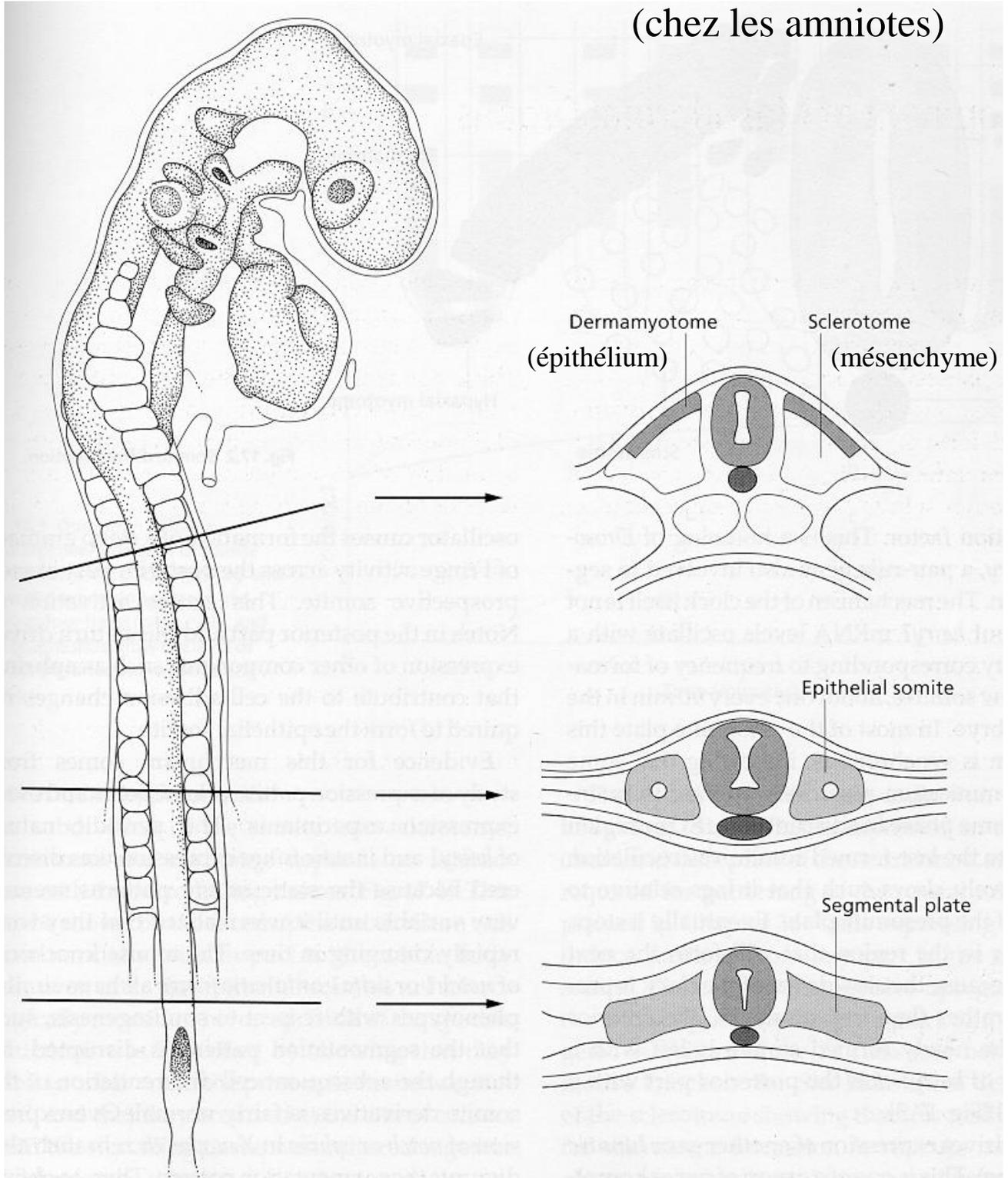
EphA4 = récepteur

(Tyrosine kinase)

L'interactions ephrineB2 –
EphA4 provoque une
« répulsion » entre les 2
cellules

→ segmentation

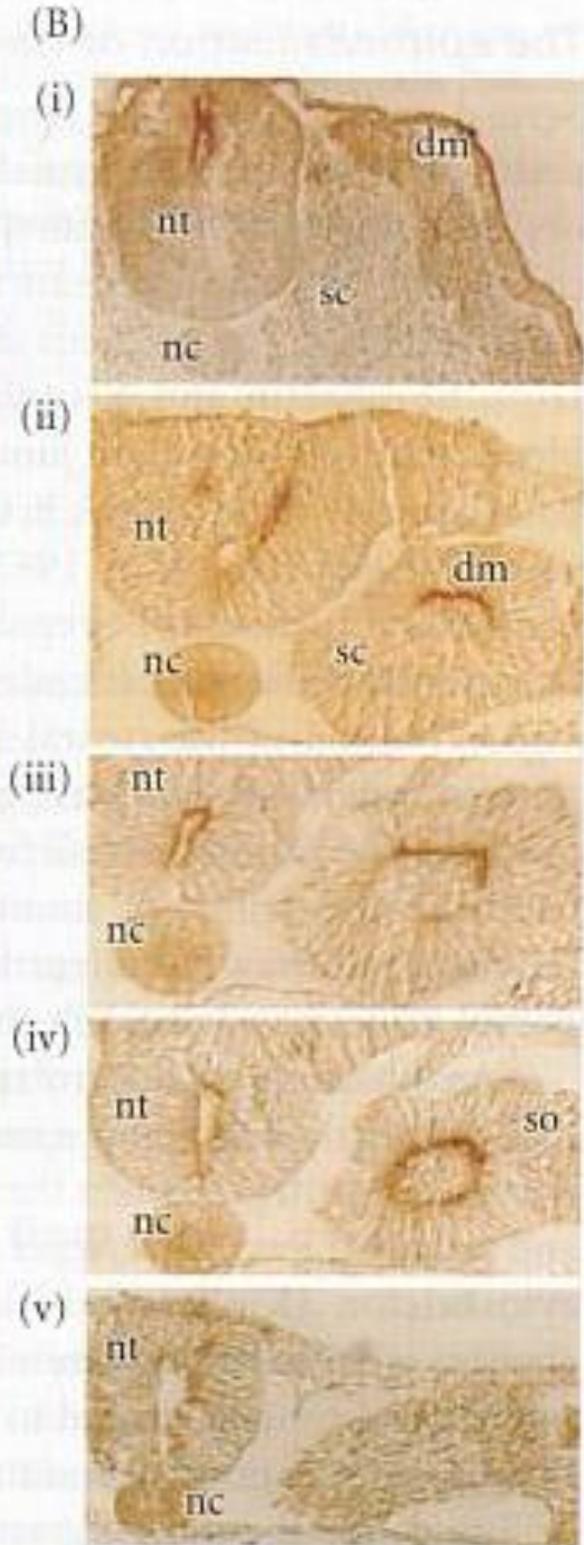
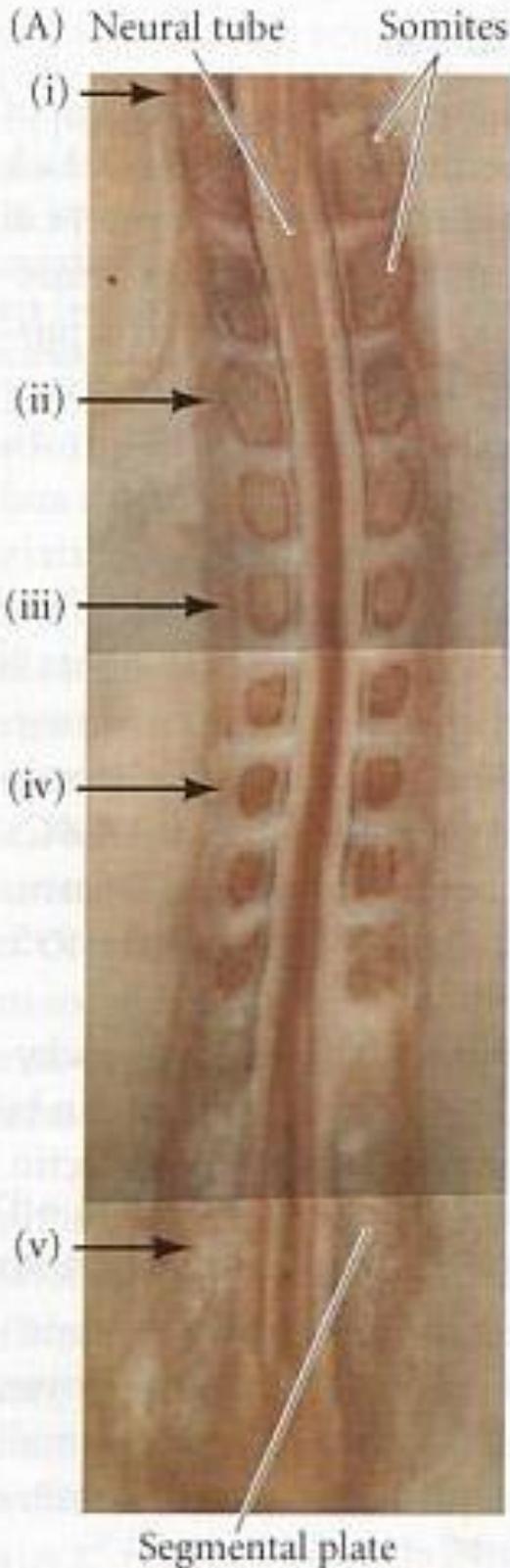
Évolution de la forme des somites durant le développement (chez les amniotes)



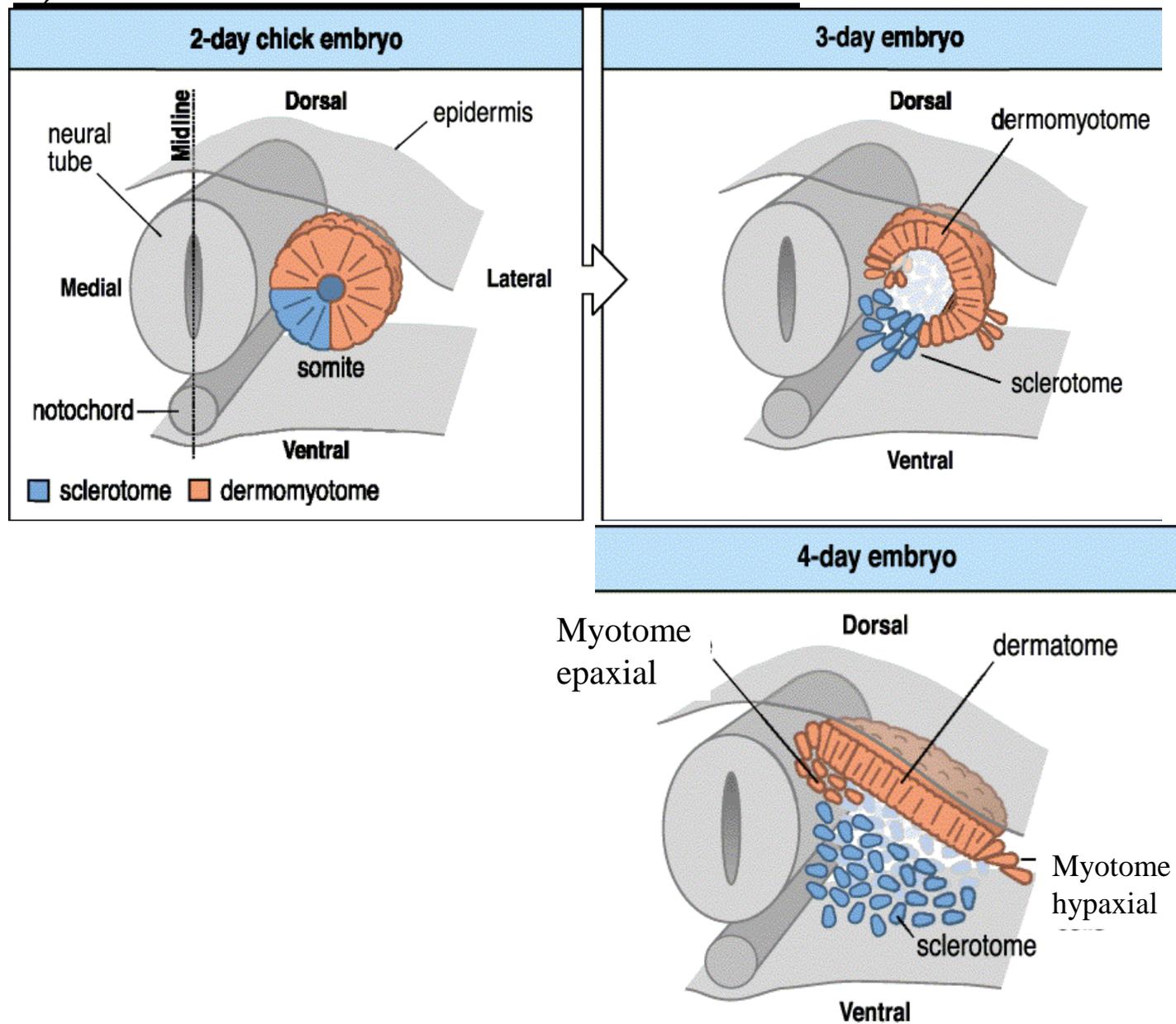
Changement de morphologie des somites durant le développement

Transitions « mésenchyme » → épithélium → mésenchyme
par changement d'adhésion cellulaire

Immunohistochimie réalisée avec un anticorps N-cadhérine (embryon de poulet)



2) Subdivision et destin des somites



Sclérotome → vertèbres et côtes

Dermatome → derme du côté dos

Myotome → tous les muscles squelettiques

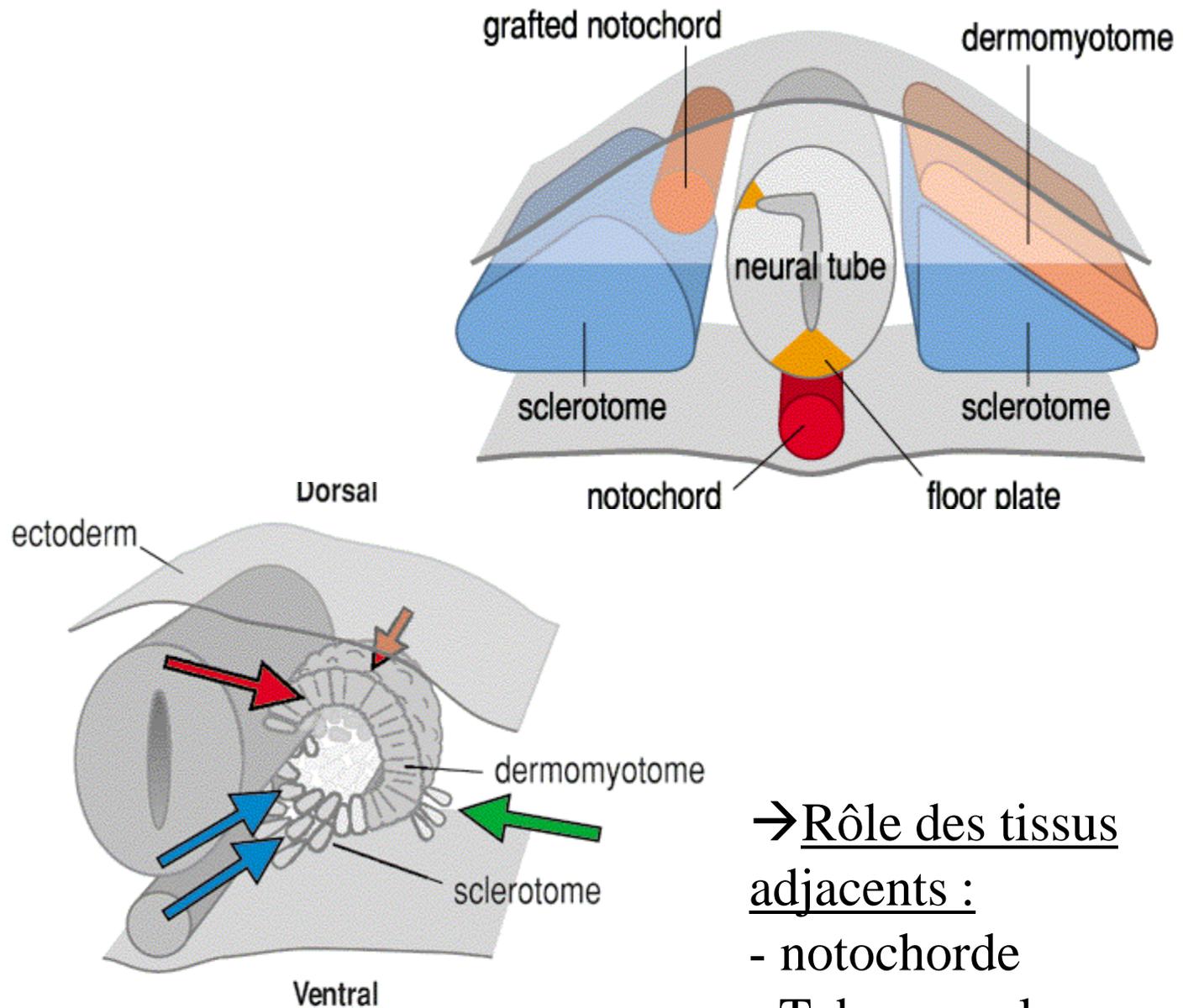
Etude du destin des somites

par génération de « chimères » caille-poulet

Remplacement de parties de somites de poulet par celui de caille
(distinction cytologique des 2 espèces)

Influence des tissus adjacents sur la différenciation des cellules des somites

- Rotation de « somites épithéliales » → développement normal (cellules non déterminées)
- Transplantation de notochorde → formation excessive de sclérotome

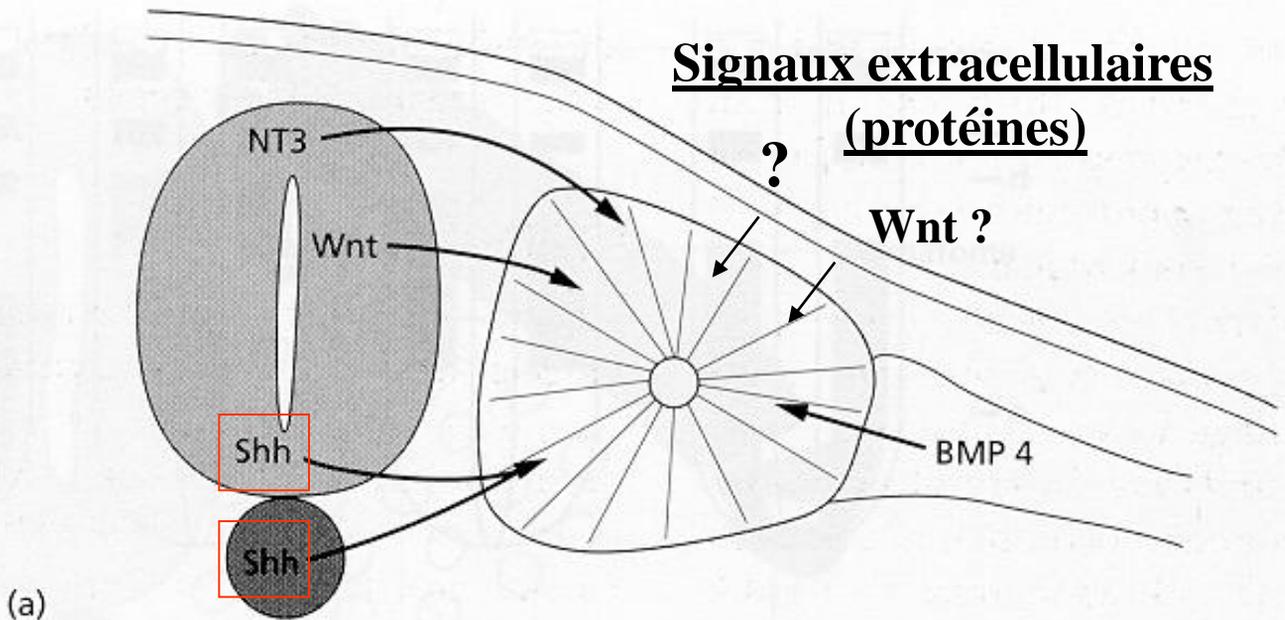


→ Rôle des tissus adjacents :

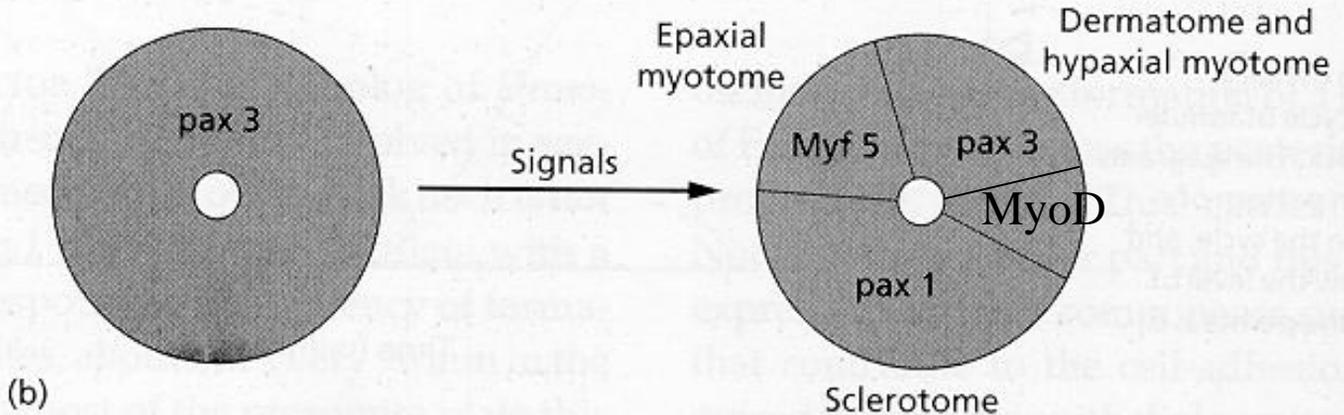
- notochorde
- Tube neural
- épiderme
- mésoderme latéral



Nature des signaux extracellulaires impliqués dans le « patterning » (déterminés par gain ou perte de fonction)



Facteurs transcriptionnels exprimés dans les somites



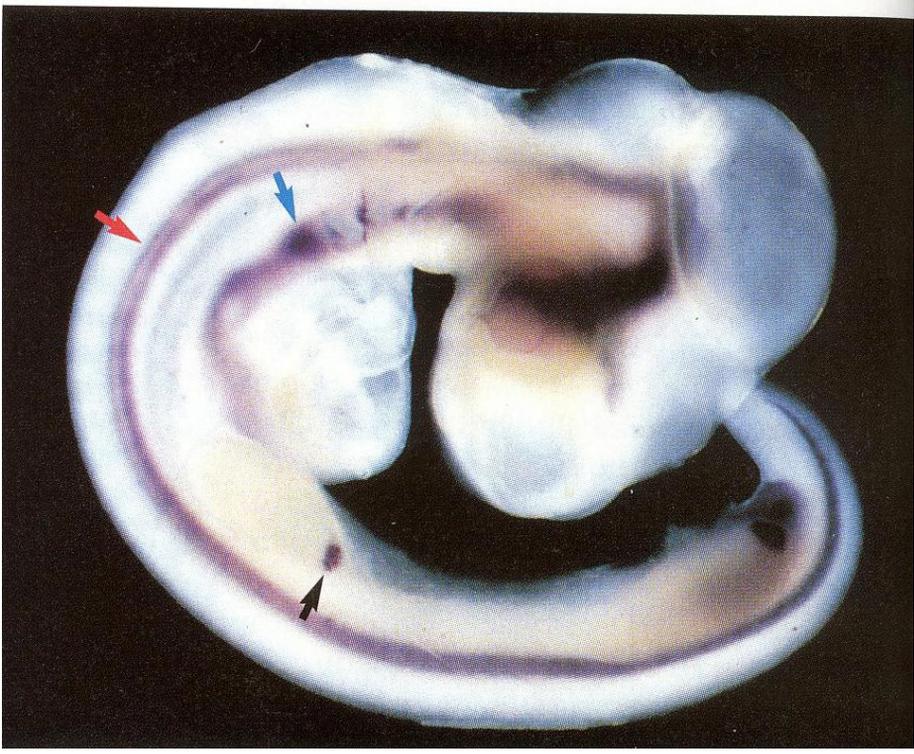
Les signaux extracellulaires induisent l'expression de différents facteurs transcriptionnels :

Sonic hedgehog → sclérotome (Pax1, Id et inhibition de Pax3)(shh -/- ont des somites fortement affectées)

Shh + Wnt1(3a) → myotome épaxial (**Myf5**)

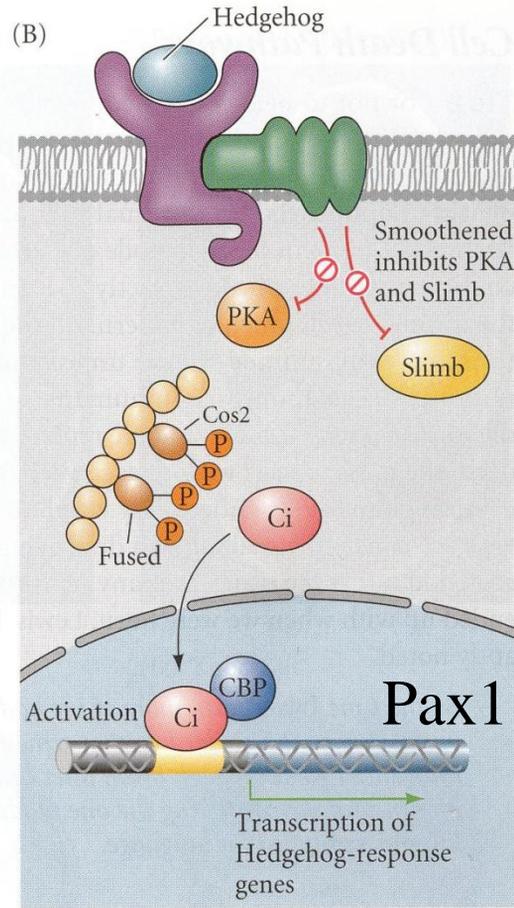
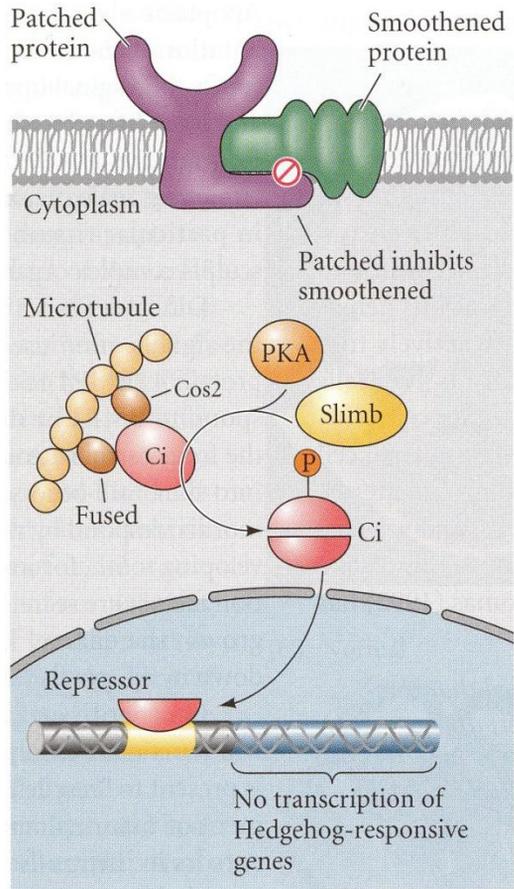
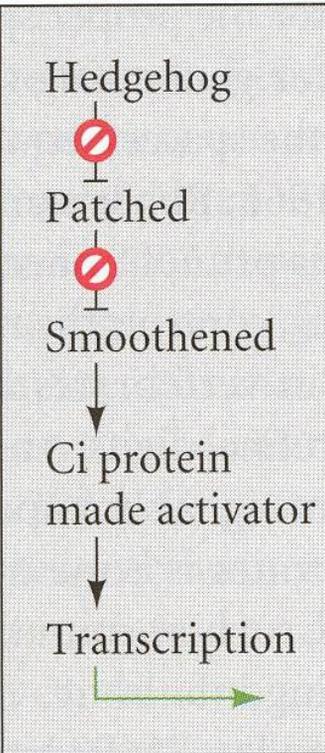
BMP4 + Wnt? → myotome hypaxial (**MyoD**)

Expression de Sonic hedgehog



- Notochorde + (plancher du T.N.)
- Bourgeons des membres
- t. digestif antérieur

Voie de signalisation Hedgehog



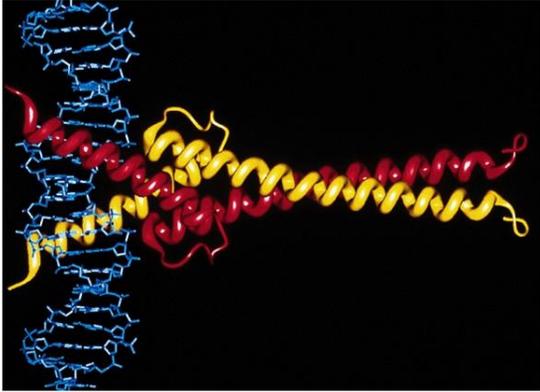
Les facteurs impliqués dans la myogenèse

Les muscles squelettiques proviennent des cellules du dermamyotome.

«**Muscle Master genes** » : les facteurs bHLH :

myf5, myoD, MRF4 et myogénine, identifiés en 1987 par « gain de fonction » : transfection de fibroblastes en culture

→ « fibres musculaires »

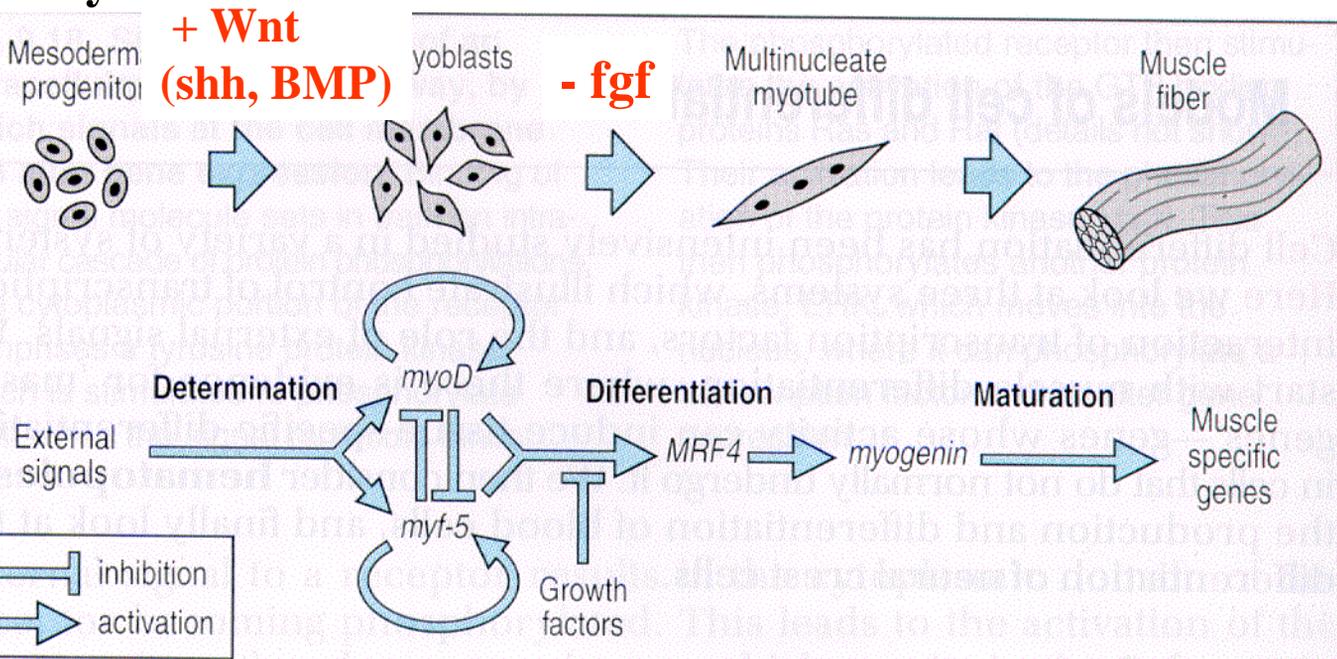


Rappel :

Structure des bHLH

→ Id : HLH sans domaine basique exprimé dans le sclérotome

Analyse des souris « knock-out » → modèle de différenciation



N.B.: redondance entre myoD et Myf5

(NB: différence avec les muscles lisses et cardiaques provenant du mésoderme latéral.)

Remodelage Antéro-Postérieur des somites

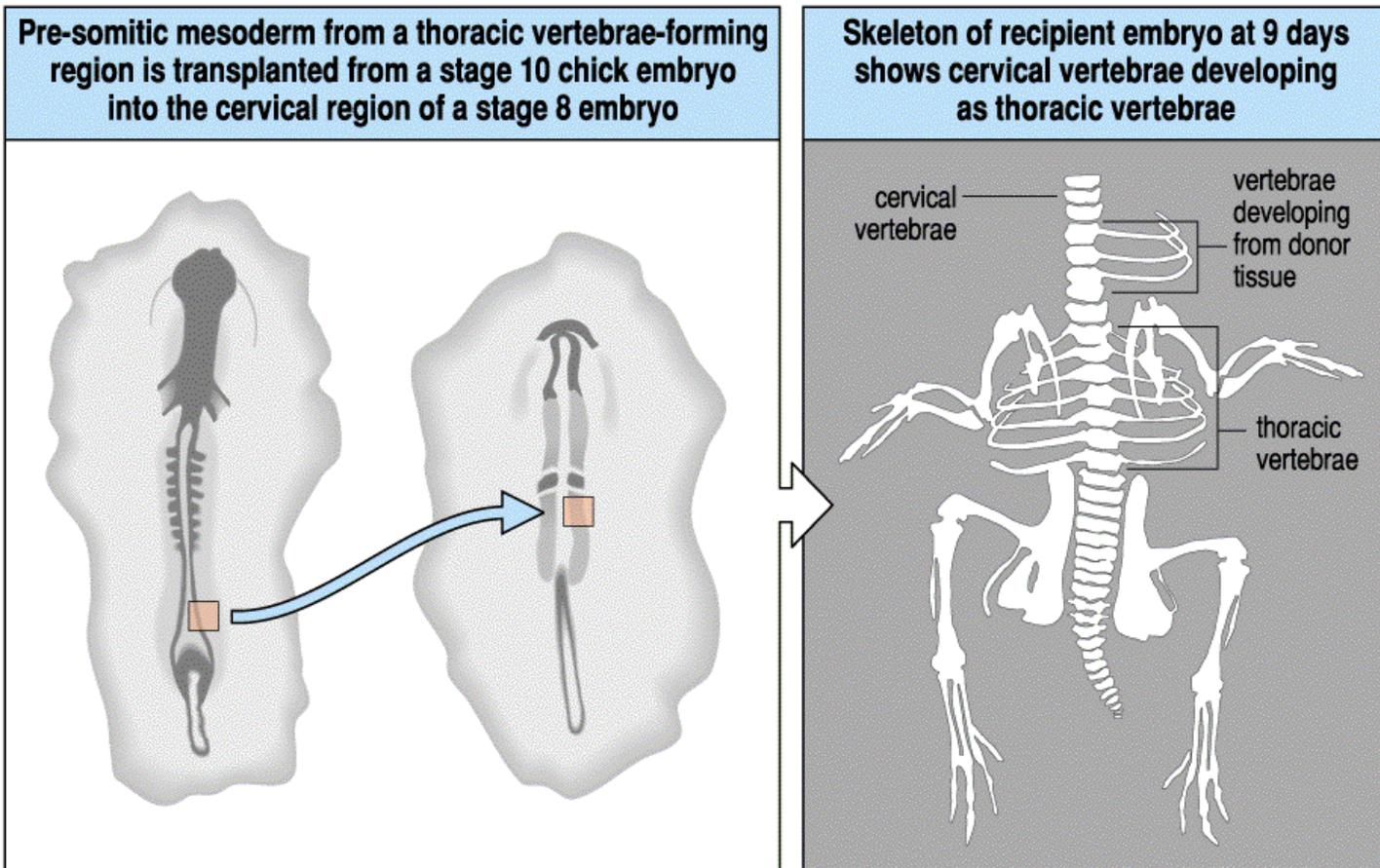
Les somites génèrent les vertèbres

-Différences dans l'axes Antéro-Postérieur

Expérience de transplantation

→ Les différences A-P sont déterminées

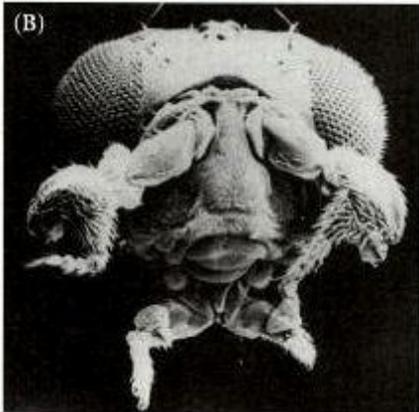
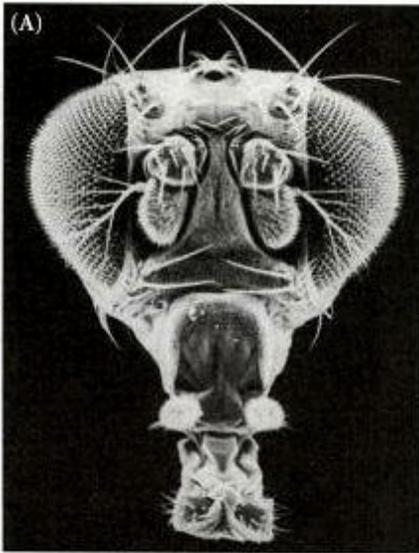
avant la somitogénèse (durant la gastrulation).



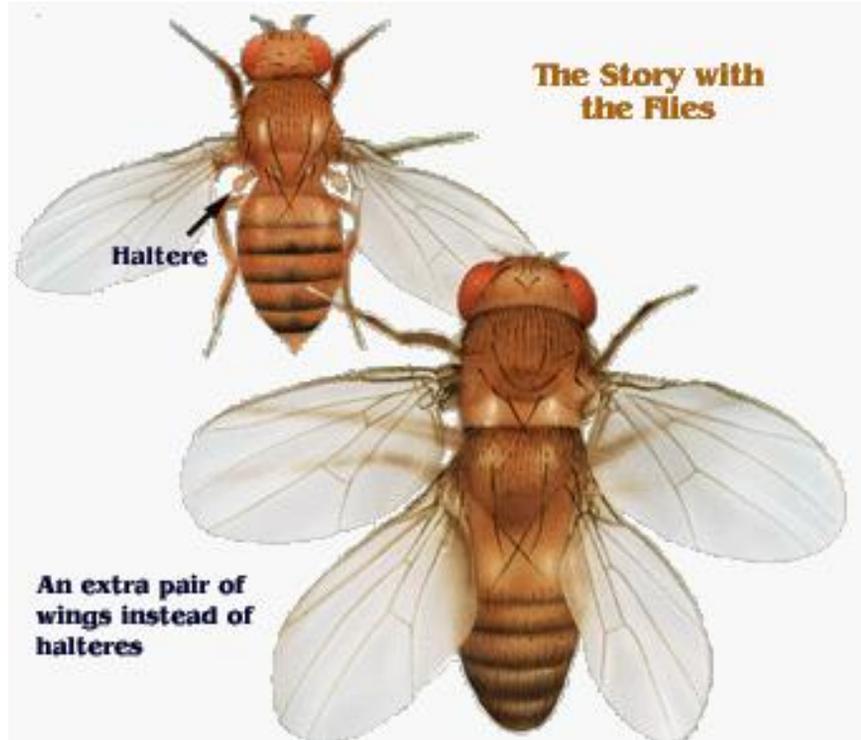
Facteurs impliqués dans cette spécification A-P :

Les facteurs HOX (similarité avec la drosophile) :
(facteurs de transcription à homéodomaine)

Découverte des facteurs Hox chez la drosophile par les « mutations homéotiques » :



Antennapedia



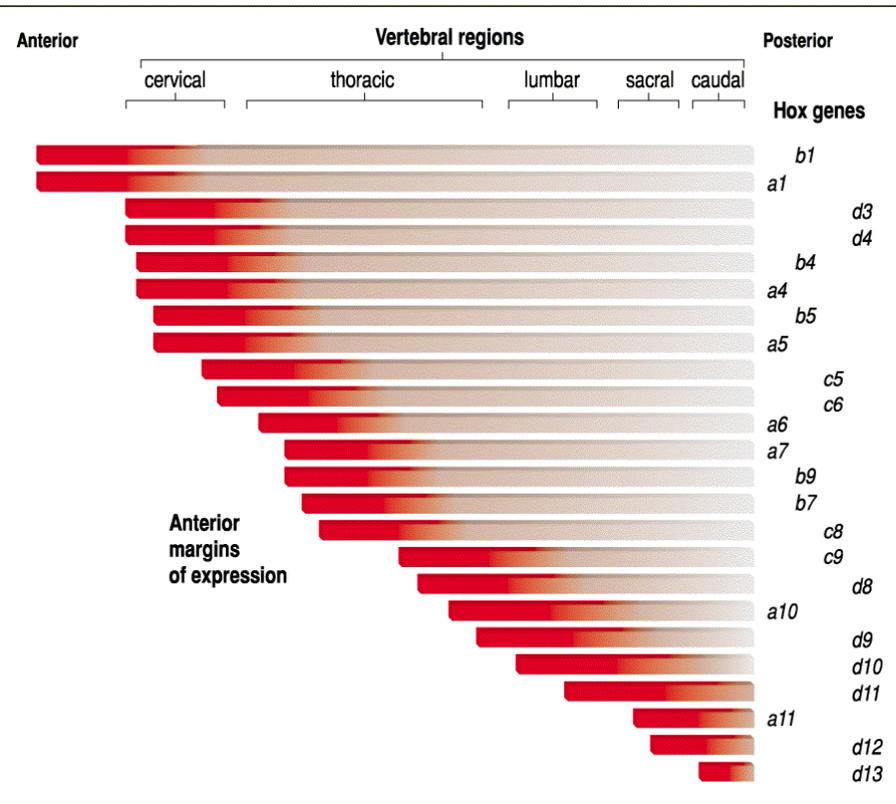
ultrabithorax

Transformation de l'identité d'un segment en un autre

→ Particularité des facteurs HOX :

Leur localisation dans le cluster chromosomique correspond à leur expression dans l'axe A-P

Expression des HOX dans le mésoderme paraxial



Le « code Hox » définissant le destin des somites

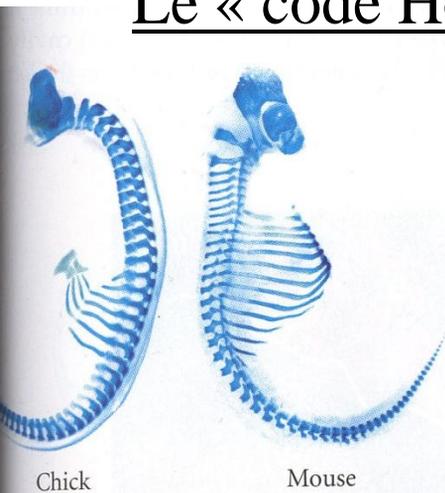
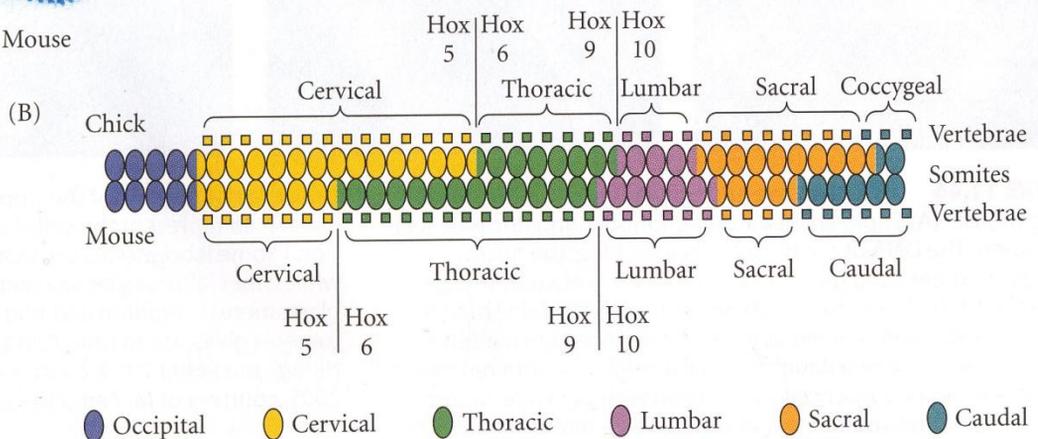
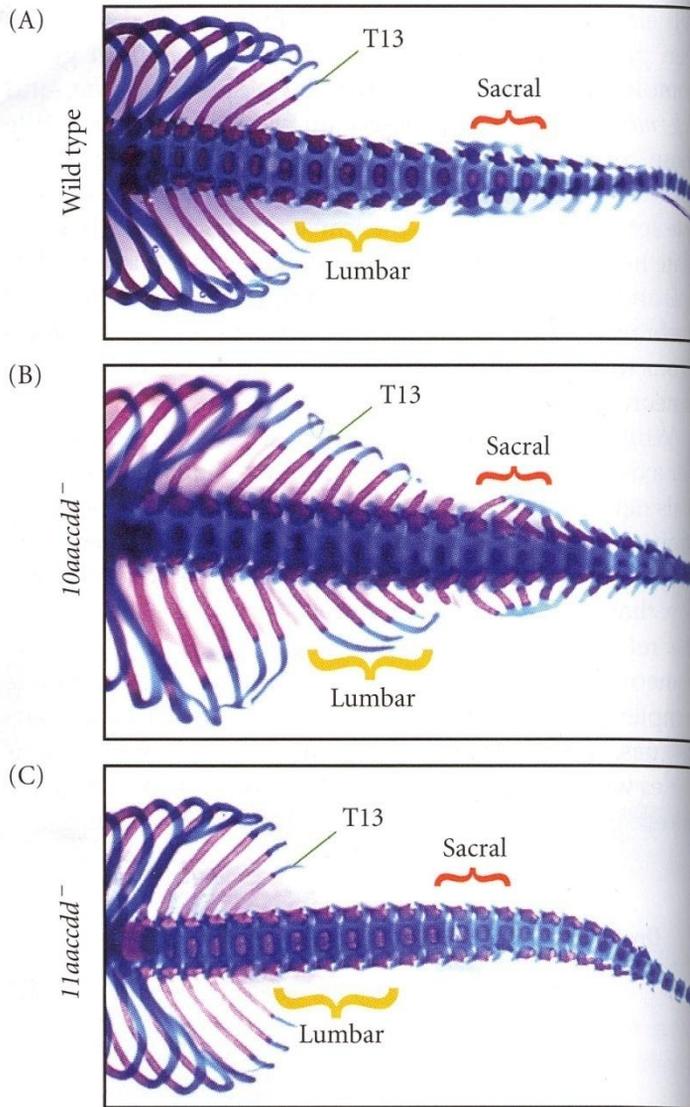


FIGURE 11.45 Schematic representation of the chick and mouse vertebral pattern along the anterior-posterior axis. (A) Axial skeletons stained with Alcian blue at comparable stages of development. The chick has twice as many cervical vertebrae as the mouse. (B) The boundaries of expression of certain Hox gene paralogous groups (*Hox5/6* and *Hox9/10*) have been mapped onto the vertebral type domains. (A from Kmita and Duboule 2003, photograph courtesy of M. Kmita and D. Duboule; B after Burke et al. 1995.)



Role des hox dans l'identité des vertèbres

« Knock-out » chez la souris → transformation homéotique



NB : redondance entre gènes
Hox paralogues

KO des gènes hox10
: Vertèbres lombaires
→ vertèbres thoraciques

KO des gène hox11
: Vertèbres sacrées →
vertèbres lombaires

FIGURE 11.43 Axial skeletons of mice in gene knockout experiments. Each photograph is of an 18.5-day embryo, looking upward at the ventral region from the middle of the thorax toward the tail. (A) Wild-type mouse. (B) Complete knockout of *Hox10* paralogues (*Hox10aacdd*) converts lumbar vertebrae (after the thirteenth thoracic vertebrae) into more ribbed thoracic vertebrae. (C) Complete knockout of *Hox11* paralogues (*Hox11aacdd*) transforms the sacral vertebrae into copies of lumbar vertebrae. (After Wellik and Capecchi 2003, photographs courtesy of M. Capecchi.)

Le mésoderme latéral et le développement des membres

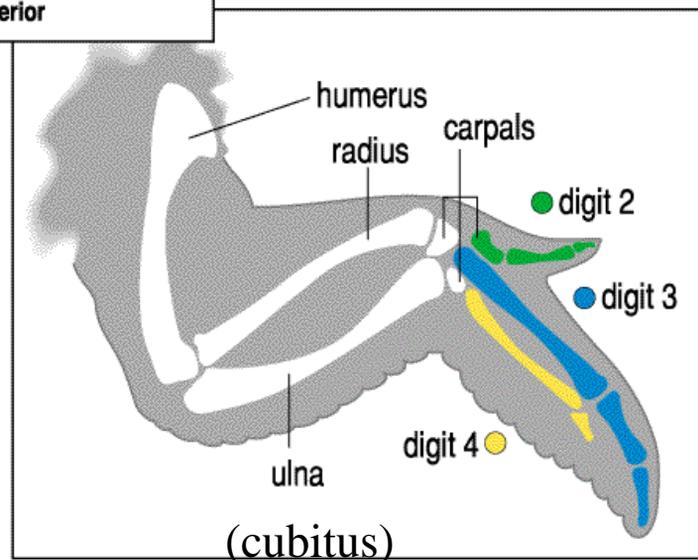
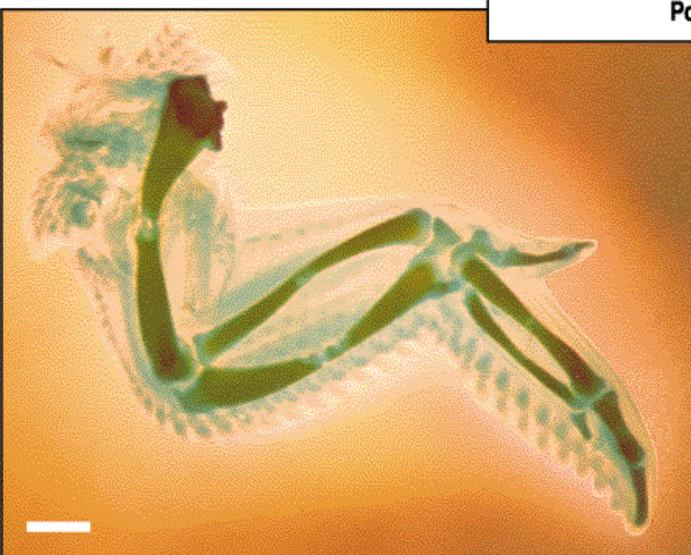
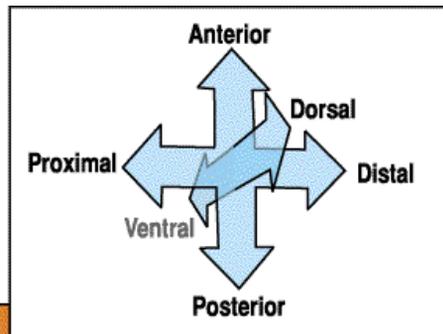
(très étudié chez le poulet; mais mécanisme similaire chez tous les tétrapodes)

Questions : Quels sont les facteurs contrôlant :

- 1) La position des bourgeons sur l'axe A-P (2)
- 2) Différence entre membres antérieurs et postérieurs
- 3) La croissance des bourgeons → membres

La morphogénèse des membres

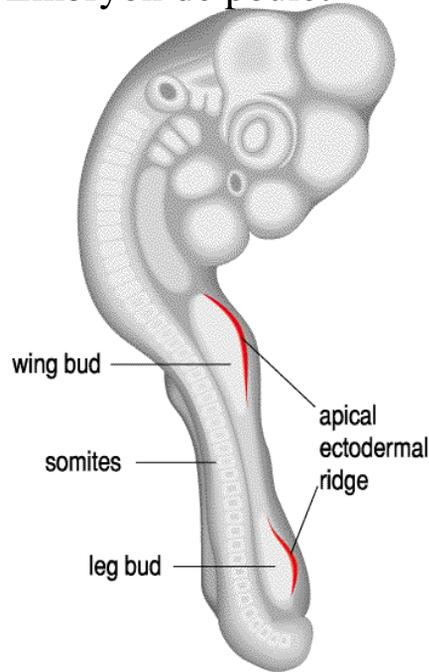
- 4) sur l'axe Antero-Postérieur
- 5) sur l'axe Dorso-ventral
- 6) sur l'axe Proximo-Distale



(Axe Proximo-Distal)

Le mésoderme latéral et le développement des membres

Embryon de poulet

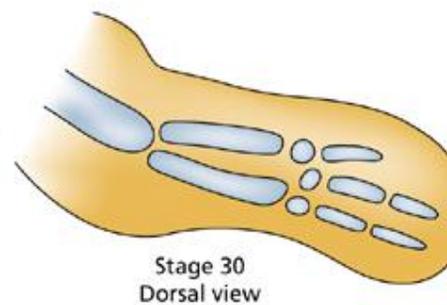
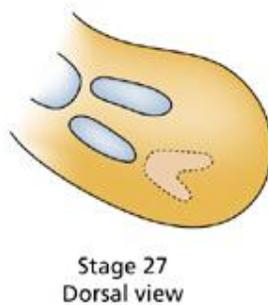
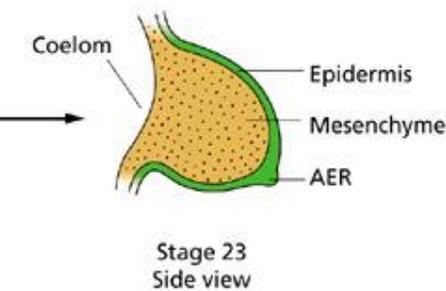
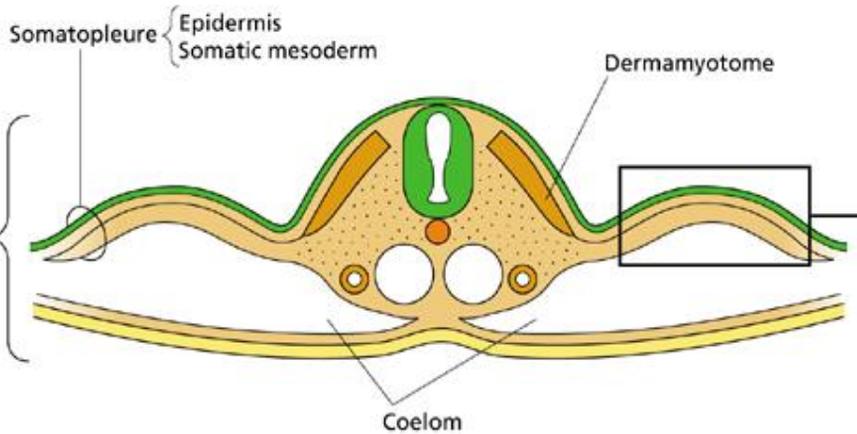
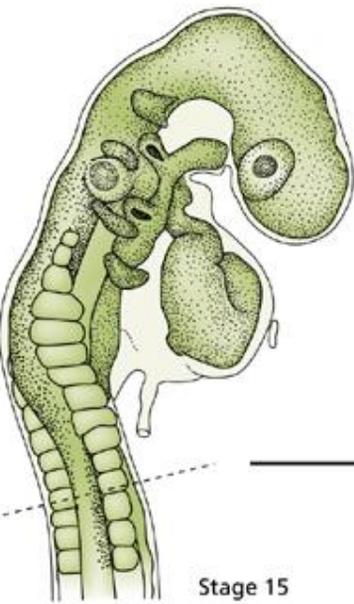


Les membres se forment à partir de 2 paires de bourgeons comprenant :

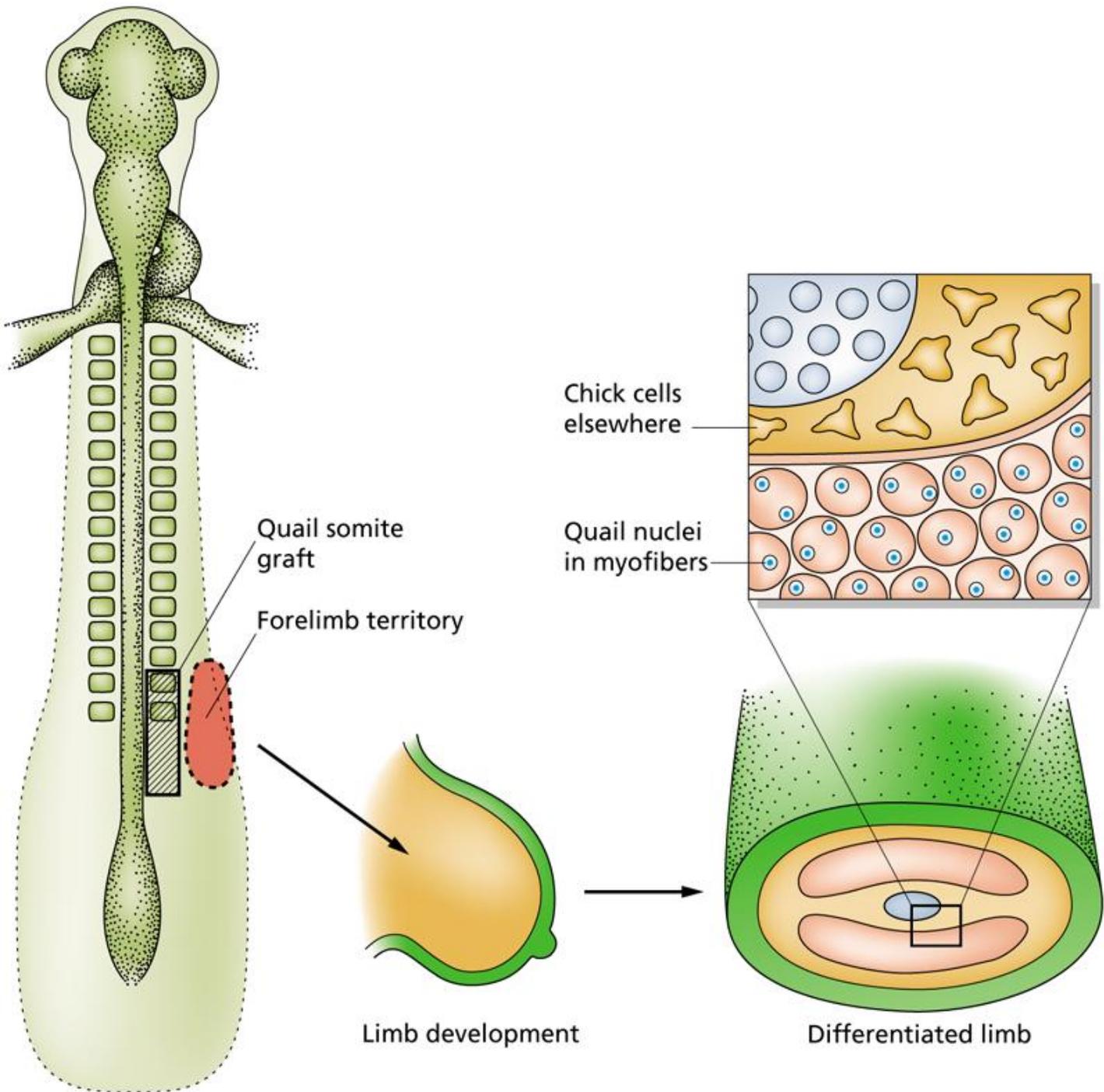
-le mésoderme latéral (mésenchyme)

-l'épiderme (AER)

(« Apical Ectodermal Ridge »)
crête apicale ectodermique



Les membres proviennent du mésoderme latéral somatique et de l'épiderme ; MAIS :
Muscles : provenant des somites (myotome hypaxial)

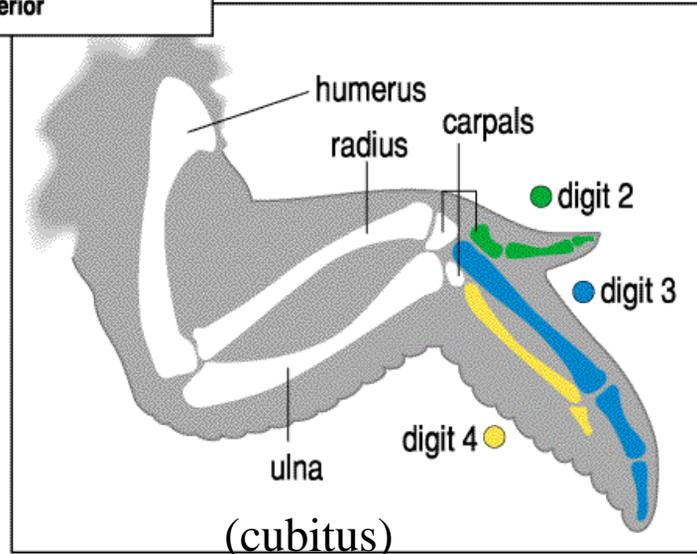
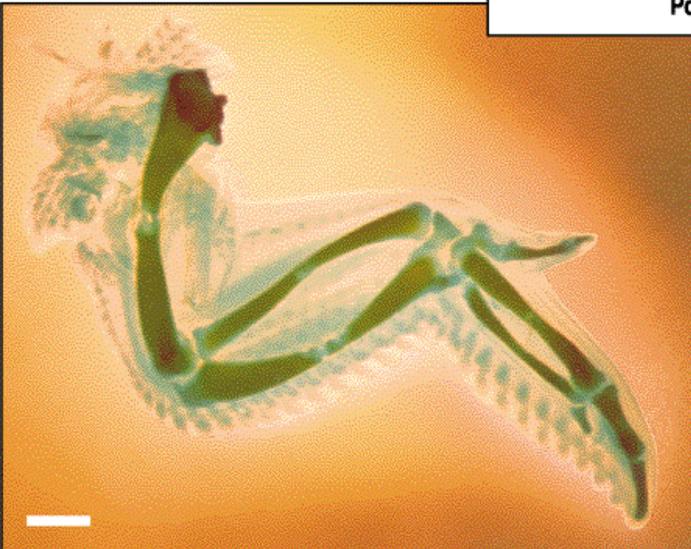
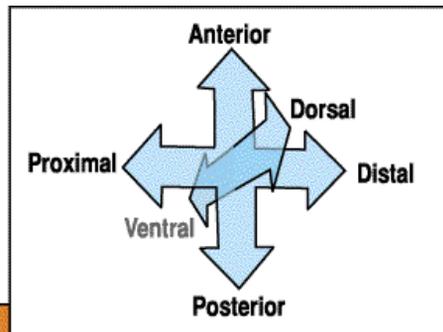


Questions : Quels sont les facteurs contrôlant :

- 1) La position des bourgeons sur l'axe A-P (2)
- 2) Différence entre membres antérieurs et postérieurs
- 3) La croissance des bourgeons → membres

La morphogenèse des membres

- 4) sur l'axe Antero-Postérieur
- 5) sur l'axe Dorso-ventral
- 6) sur l'axe Proximo-Distale



(Axe Proximo-Distal)

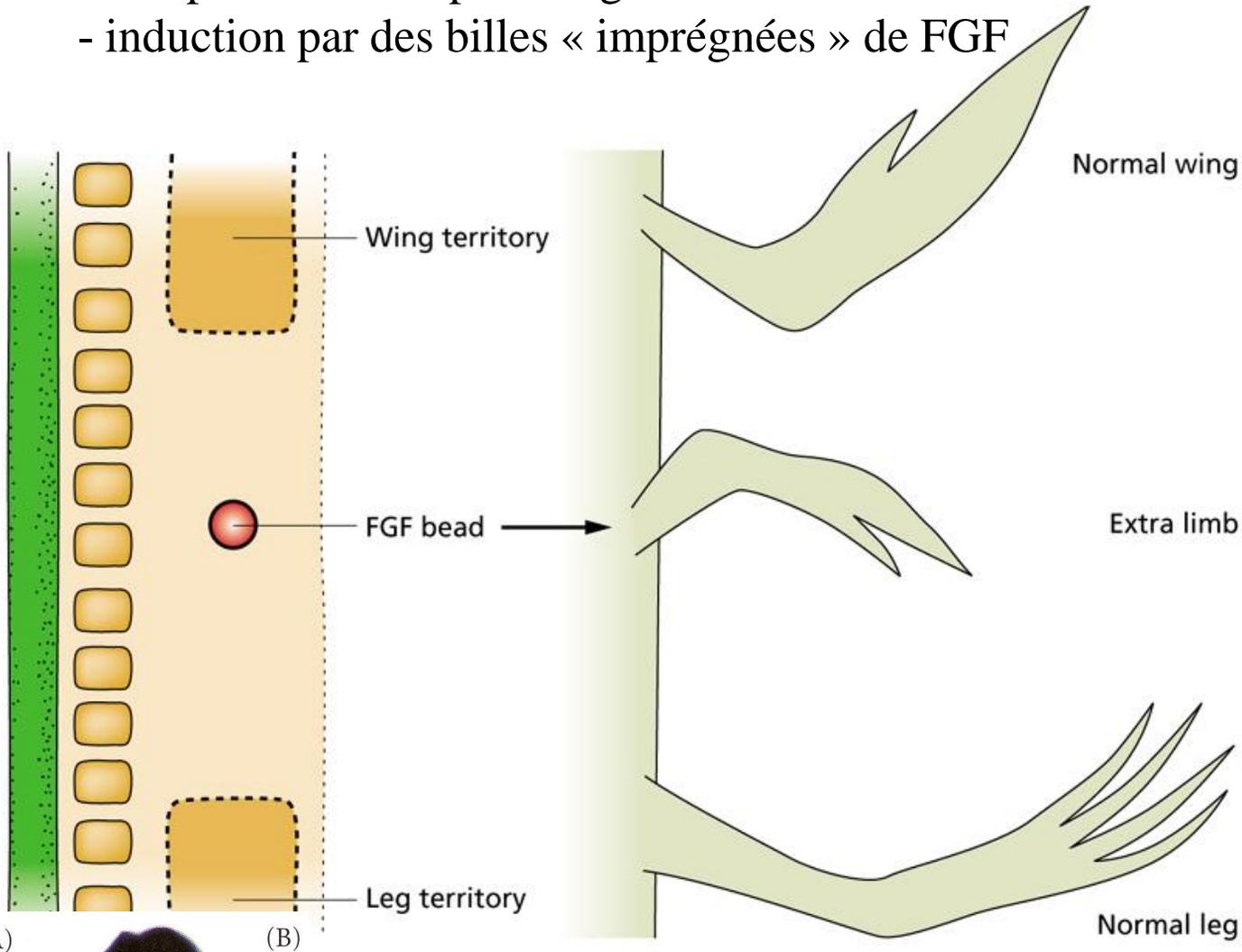
1) La position des membres dans l'axe A-P

Induction des bourgeons à 2 positions uniquement

Expériences de transplantation : déterminé par le mésoderme

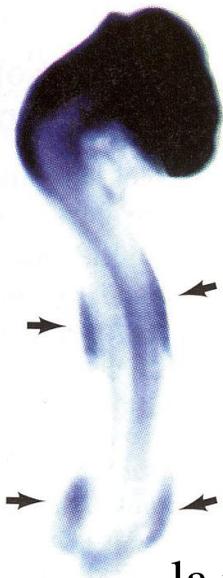
Induction par contrôlée par le signal **FGF** :

- induction par des billes « imprégnées » de FGF



: Profil d'expression de Fgf10
(hybridation in situ)

NB : position dépendant des gènes Hox ??
membres antérieurs = partie antérieure Hox 6



la mutation de fgf10 bloque la formation des bourgeons

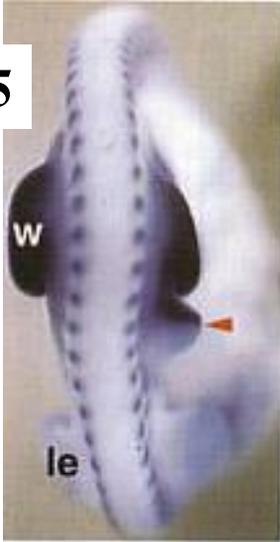
2) Facteurs déterminant les membres antérieurs et les membres postérieurs

Facteur de transcription (famille T : brachyury/noTail)

Tbx4 (membres postérieurs)

Tbx5 (membres antérieurs)

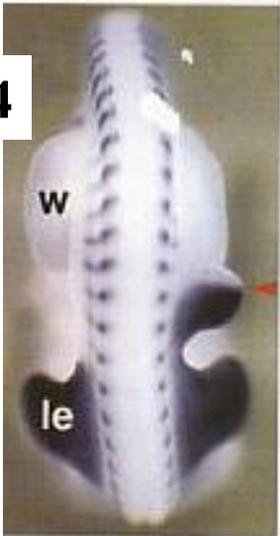
Tbx5



(E)



Tbx4



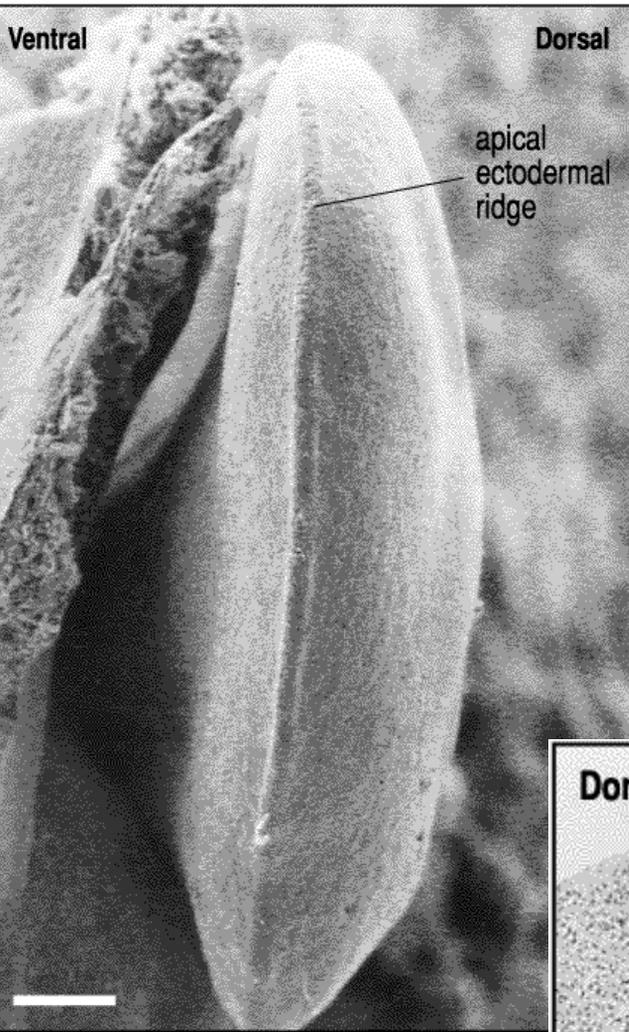
(F)



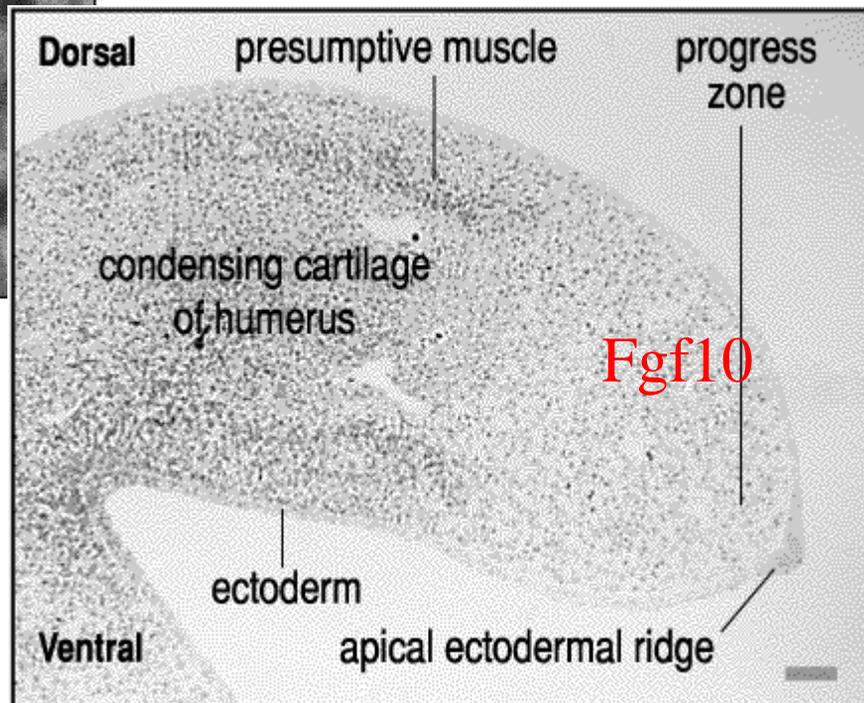
L'induction artificielle d'un bourgeon provoque un membre chimère (partie postérieure : Tbx4
partie antérieure : Tbx5)

Facteurs inducteurs de Tbx4 et Tbx5 : ??? Hox ?)

3) La croissance du bourgeon des membres



Les cellules quittant la zone de prolifération (fgf10+) forment la zone de condensation → cartilage → os

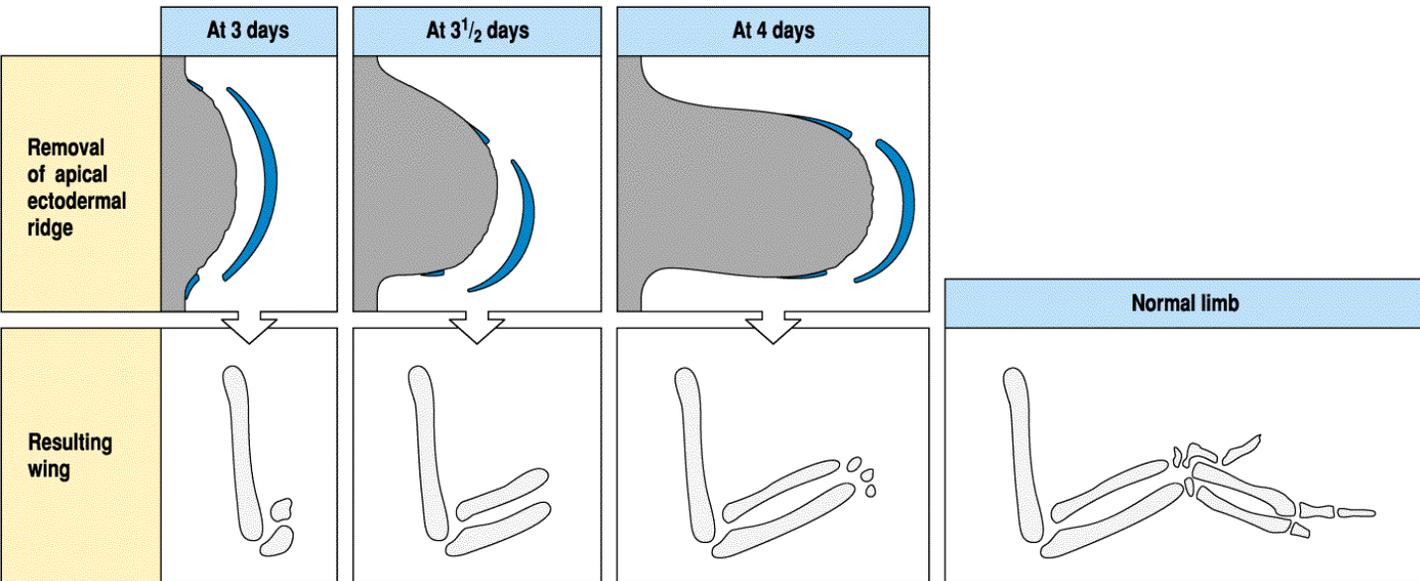


Fgf10 induit la Crête apicale ectodermique (« Apical Ectodermal Ridge » ou AER) au niveau de l'ectoderme.

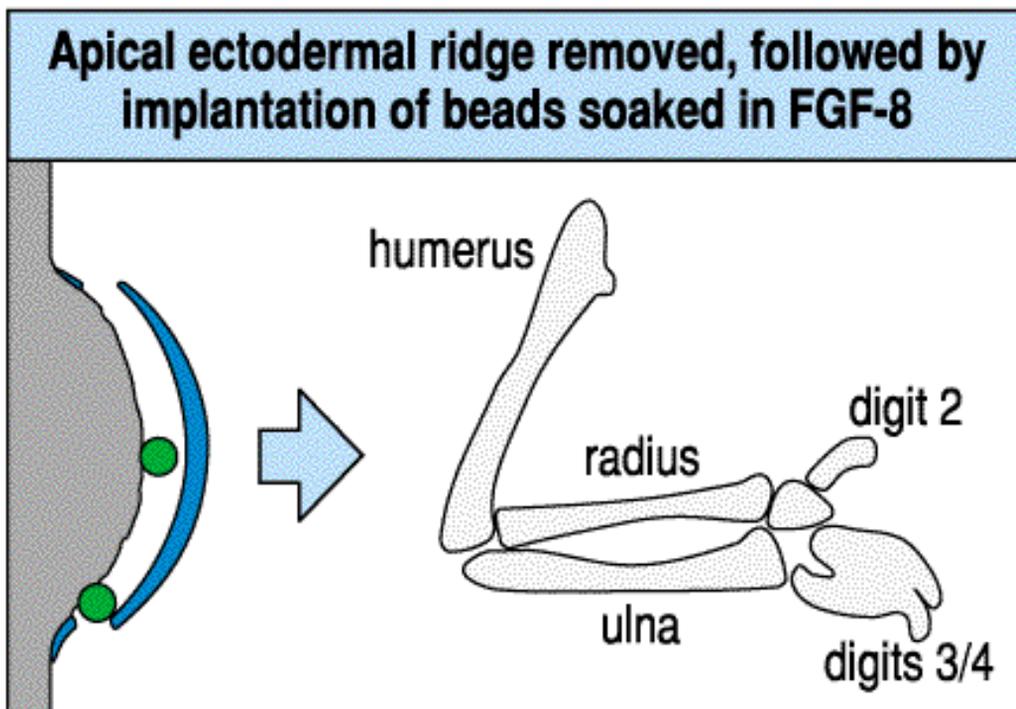
(absence d'AER dans Fgf10 -/-) .

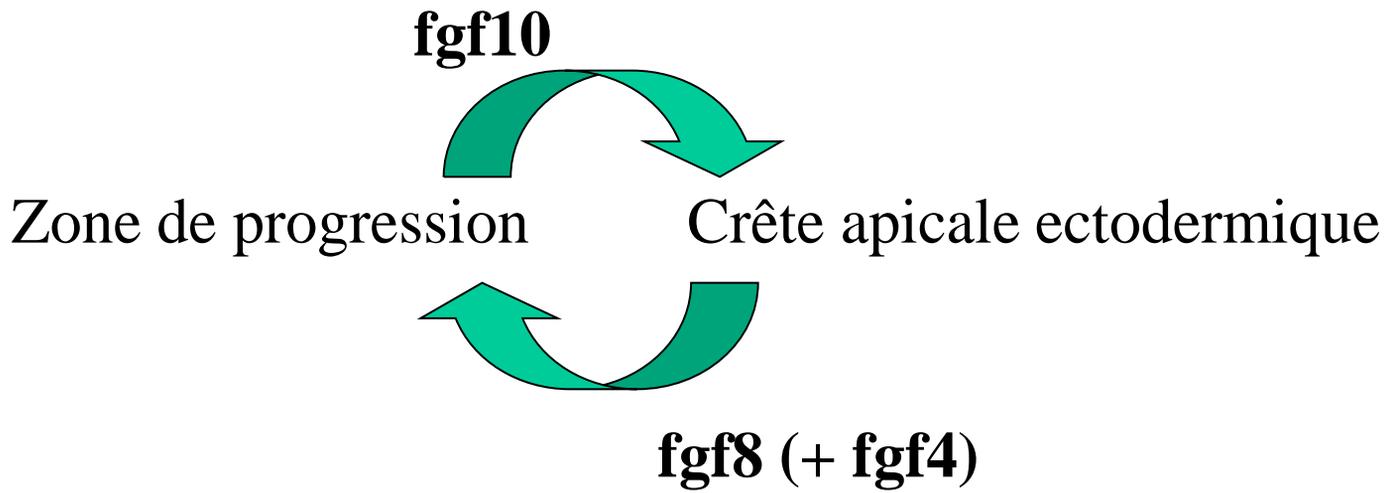
Interaction réciproque entre la zone de progression et l'AER

-Ablation de l'AER → arrêt de croissance: perte des régions distales

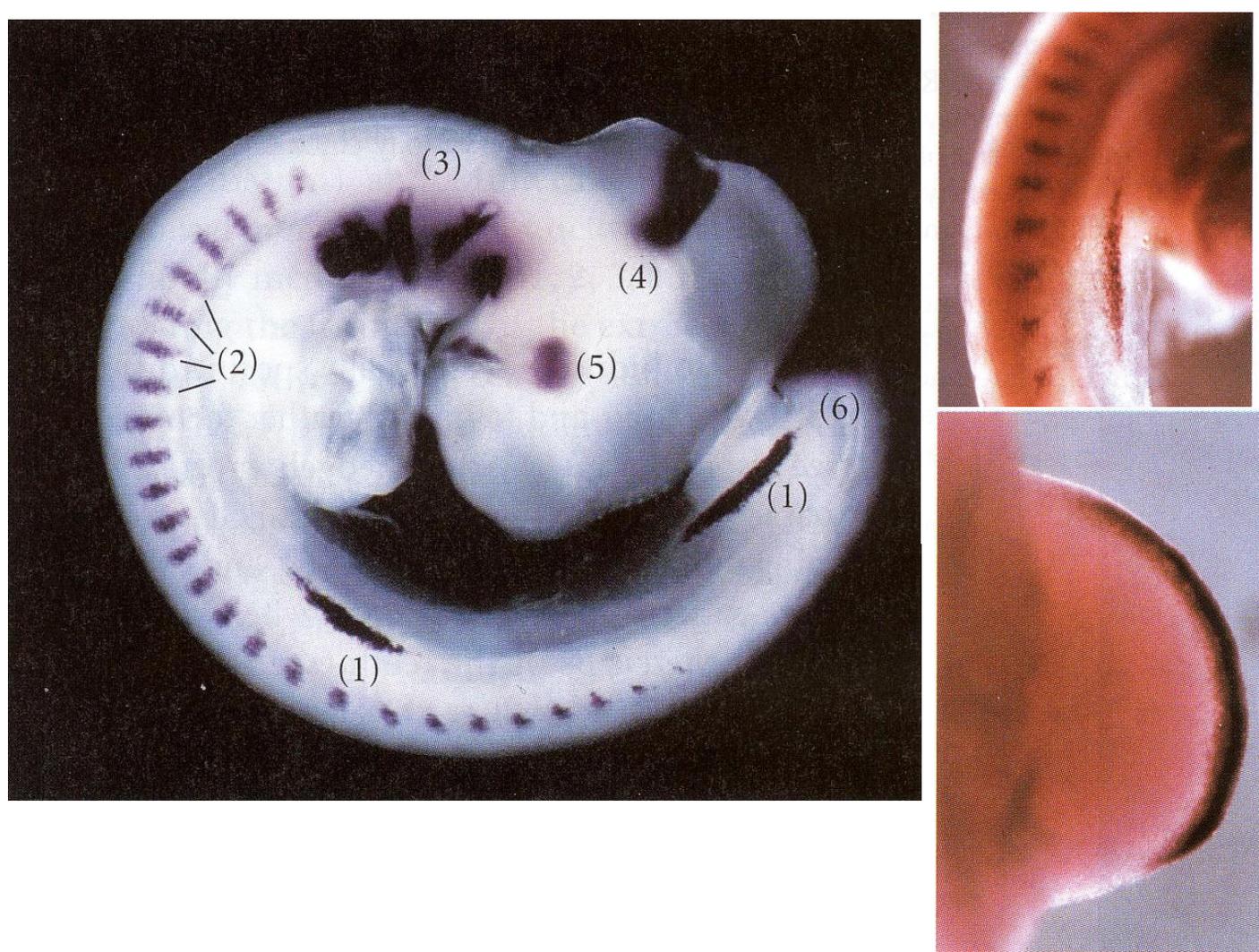


-Transplantation de l'AER à un autre site A-P
→ Dégénérescence → zone de progression nécessaire
-**FGF8** est exprimé dans l'AER et permet le maintien de la zone de progression.





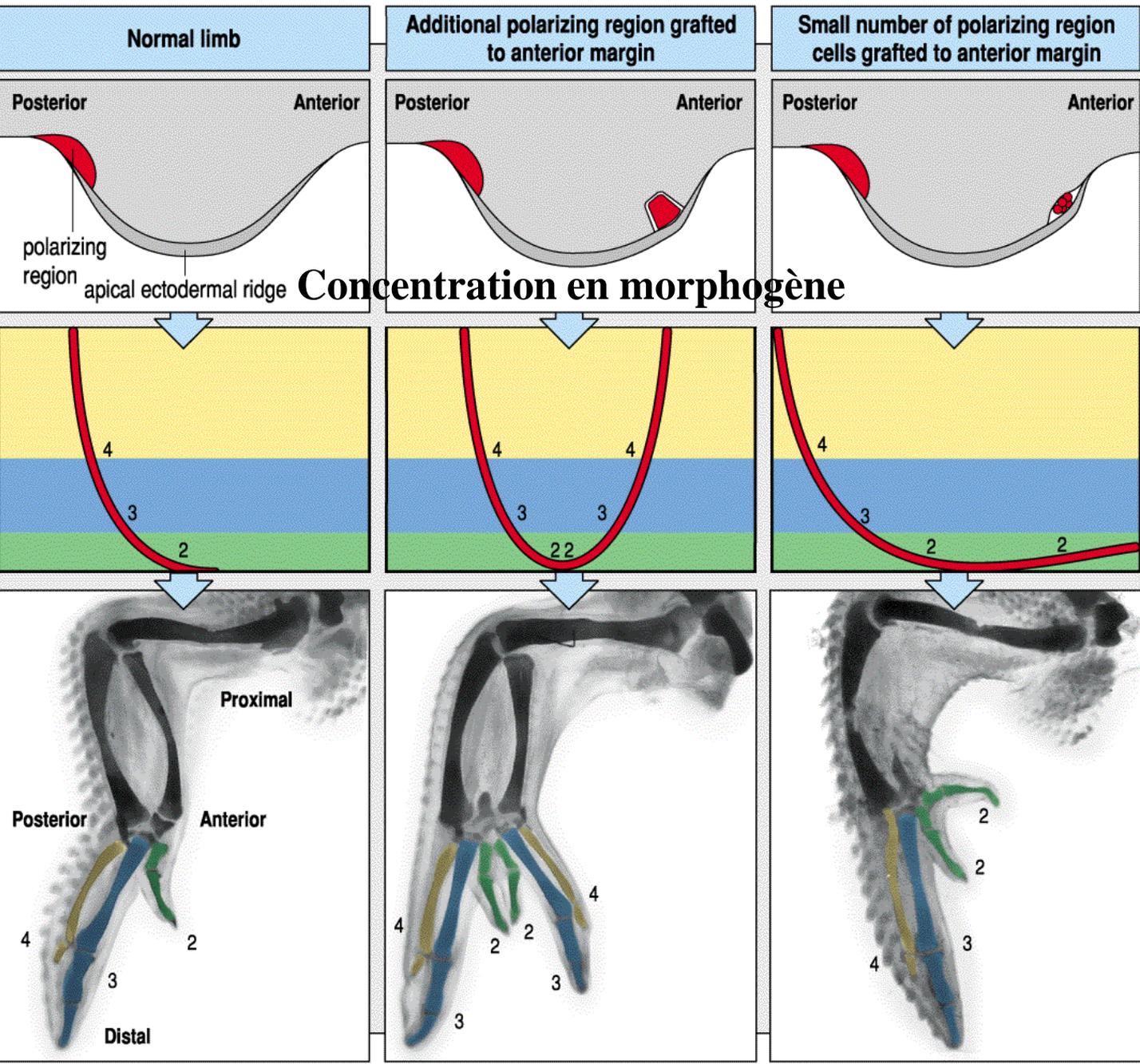
Profil d'expression de fgf8 (hybridation in situ)



- 1 : **bourgeon des membres (ailes et pattes) = AER**
- 2: somites ... 5 : rétine (induisant le cristallin)

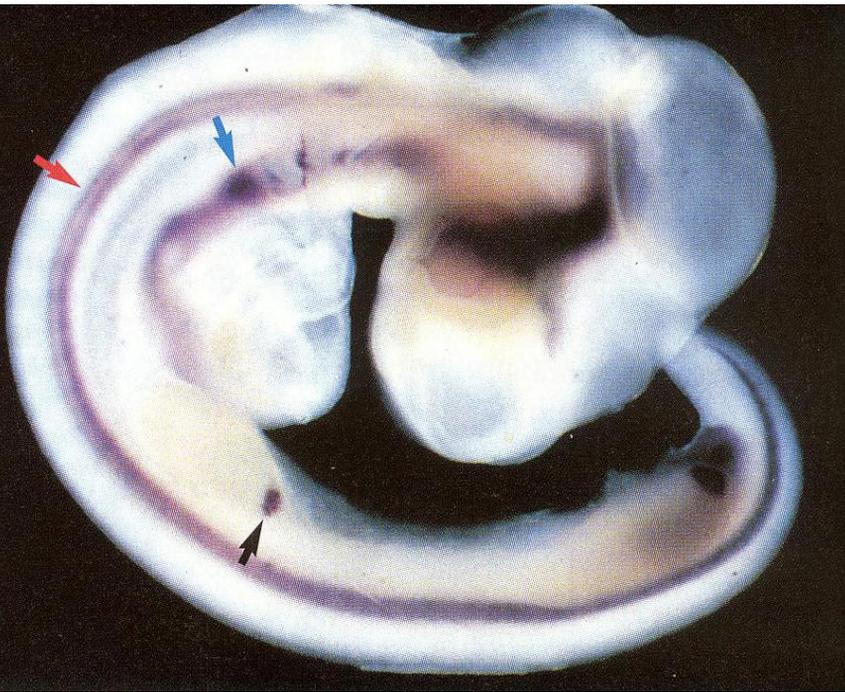
5) Le « patterning » Anterio-Postérieur

Le remodelage A-P est contrôlé par le mésoderme latéral postérieure du bourgeon : **Zone d'Activité Polarisante** relarguant un morphogène

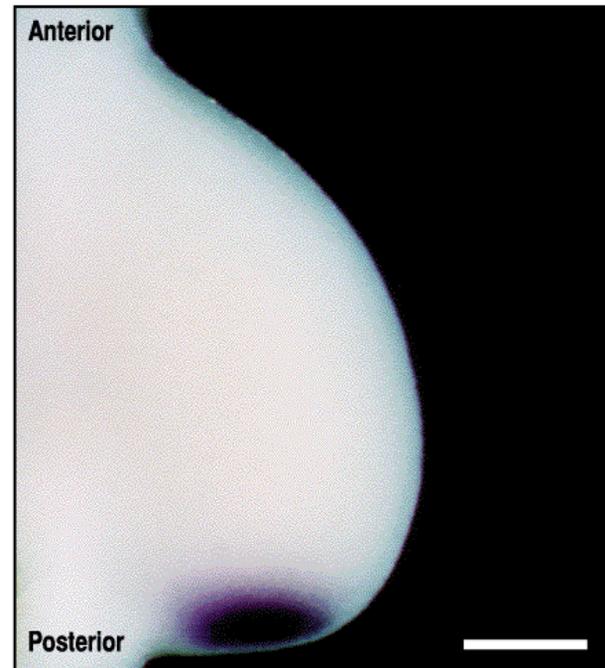
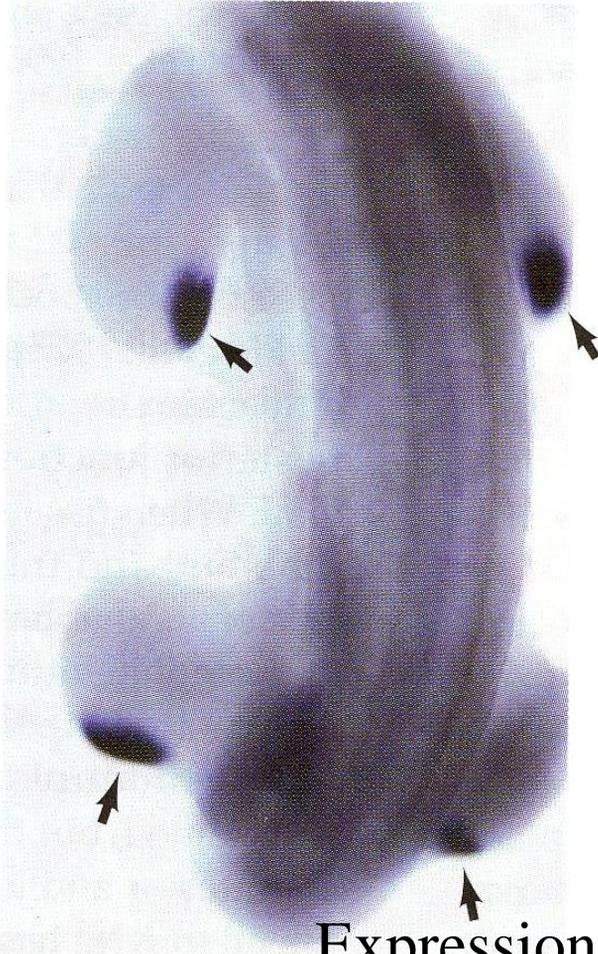


Différentes quantités → différents effets : morphogène

Le morphogène sécrété par le ZPA est Sonic hedgehog

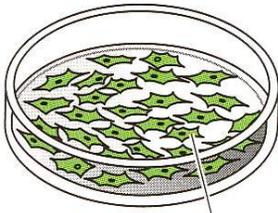


- Notochorde + (plancher du T.N.)
- Bourgeons des membres
- t. digestif antérieur



Expression de Shh dans le **ZPA** (H.I.S.)

(B) Transfect *shh*-expressing virus and allow viral spread



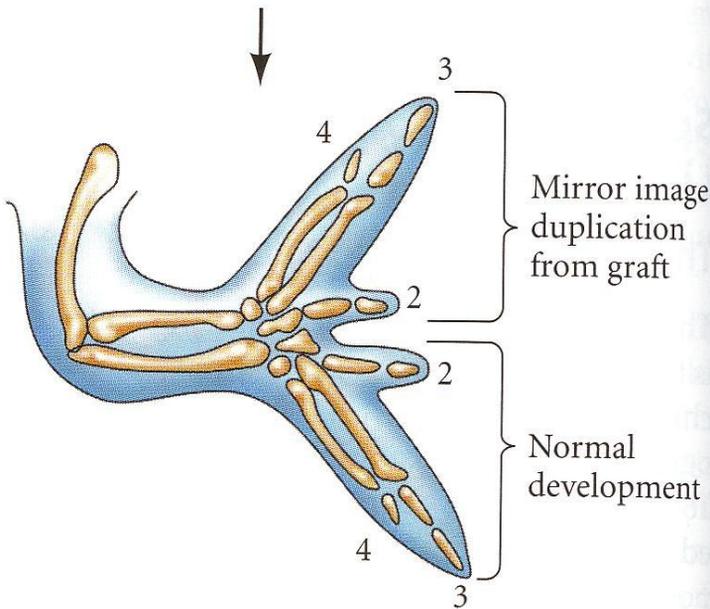
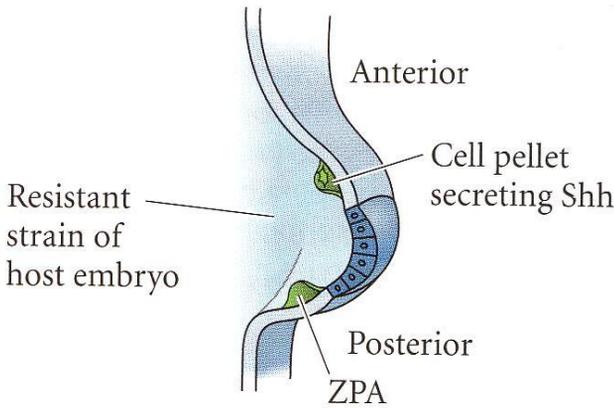
↓ Infectable strain of chick embryo fibroblast cells

Centrifuge cells



Cells containing the *shh* gene

↓ Implant in anterior portion of limb bud (stage 19–23 embryo)

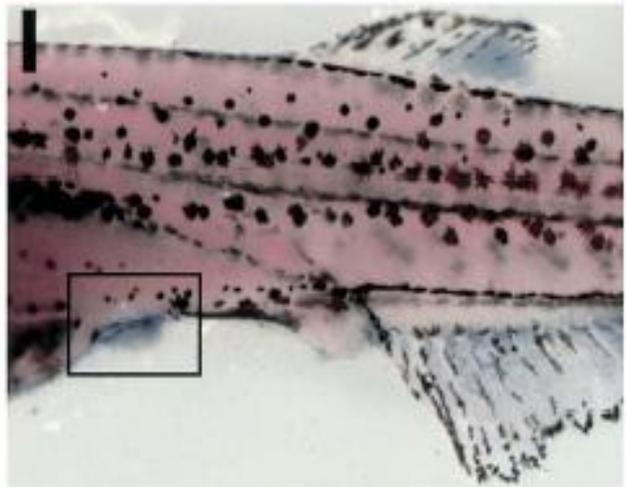
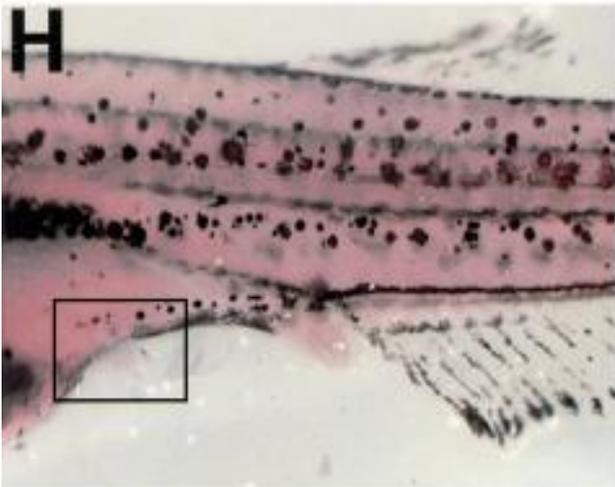
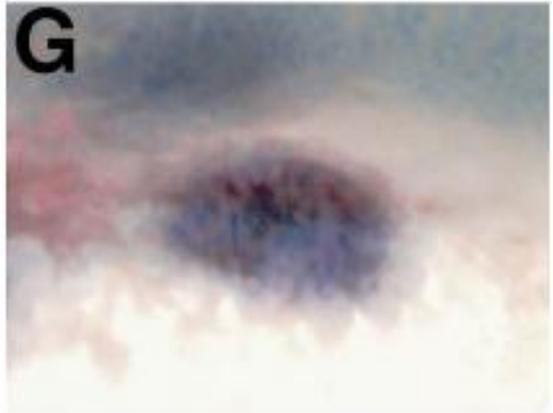
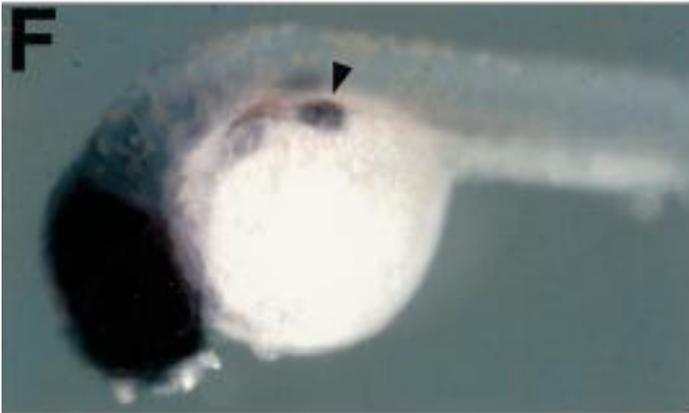


Expression ectopique de *shh* sur le coté antérieur → Duplication des parties postérieures.

Les nageoires pectorales et pelviennes des poissons correspondent aux membres des tétrapodes

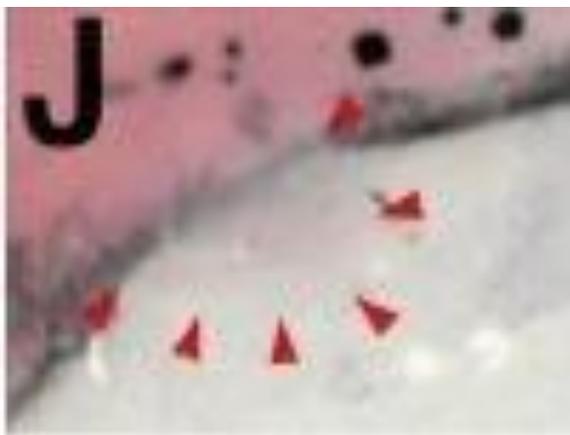
Expression de zfTbx4 et zfTbx5 chez le zebrafish

Zf-Tbx4

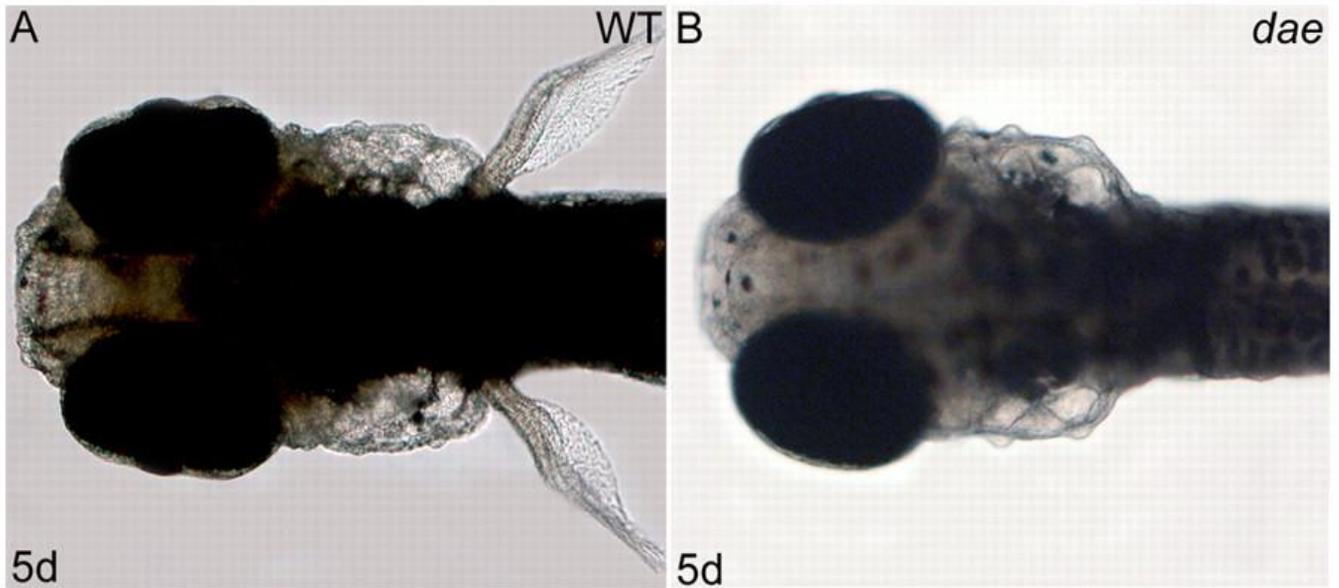


Zf-Tbx4

Zf-Tbx5



Role de *fgf10b* dans la formation des nageoires



Mutant *daedalus*(*fgf10b*)

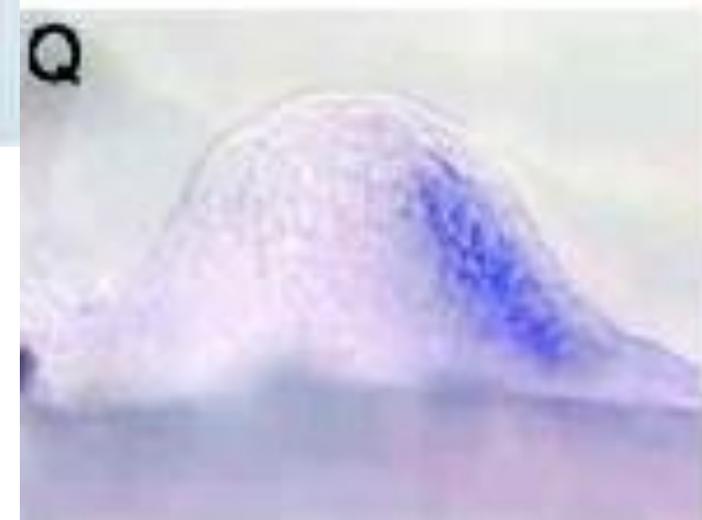
Role de sonic hedgehog

Mutation dans les gène Shh bloque la croissance des nageoires pectorales

WT

Mutant

SYU



Résumé

- Subdivision du mésoderme (axial, paraxial, intermédiaire, latéral)(dépend du gradient **BMP**)
- Segmentation du mésoderme **paraxial**
processus autonome, vague d'expression Hairy1
 - expression d'ephrine dans la partie antérieure
 - expression d'EpH dans la partie postérieure
 - segmentation
- Destin des cellules somitiques (interaction avec les tissus)
- dermamyotome → myogenèse
(**Shh** et **Wnt** ou **BMP**→**bHLH**)
- sclérotome (**Shh**)
- Patterning des somites le long de l'axe A-P (**HOX**)
- Développement des **membres** à partir du **mésoderme latéral**.
induction et croissance (**FGF**)
«patterning » sur l'axe A-P dépend de **Shh**