

SV-H Mécanismes du développement (2/3)

Exemple du développement du membre des tétrapodes

II. Développement du bourgeon du membre

A. Séquence de la mise en place du membre chiridien

B. Contrôle de l'initiation du bourgeon du membre

1. L'identité du bourgeon est associée à l'expression spécifique des gènes Tbx dans le mésenchyme
2. Les gènes homéotiques contrôlent l'expression génétique selon un axe antéro-postérieure
 - i. Présentation gènes Hox
 - ii. Le patron d'expression des gènes hoxc contrôle l'identité et la position des membres
3. La formation du bourgeon est aussi contrôlée par des facteurs paracrines
4. La crête épidermique apicale est induite par des facteurs paracrines du mésenchyme

C. Contrôle de la croissance du bourgeon

1. Un rétrocontrôle positif provoque une prolifération des cellules
2. Les gènes Hox déterminent l'identité et la position des différents segments selon un axe proximo-distal
3. induction d'un nouveau centre inducteur : la zone d'activité polarisante (ZPA)
4. La ZPA est morphogène

D. L'apoptose permet de sculpter les doigts

Résumé :

Au cours de l'organogenèse, des massifs cellulaires s'individualisent et s'organisent en fonction de leur position dans l'embryon. Ainsi par exemple, le mésoderme des lames latérales peut s'engager dans la formation du bourgeon des membres sous l'influence conjointe de **signaux paracrines** et de l'expression de certains **facteurs de transcriptions spécifiques**.

Les facteurs paracrines sont des substances sécrétées par des cellules (dites **inductrices**), qui diffusent et agissent sur les cellules voisines (dites **compétentes**) possédant un **récepteur**. Le récepteur active, par l'intermédiaire d'une cascade de signaux intracellulaires, des **facteurs de transcriptions spécifiques**. Dans le noyau, ces facteurs modifient l'expression génétique, ce qui engage la cellule réversiblement dans une voie de spécification, ou irréversiblement dans une voie de détermination puis de différenciation. La réponse de la cellule compétente dépend de la **concentration** des facteurs paracrines et des protéines exprimées (en particulier récepteurs et facteurs de transcriptions). Par exemple des facteurs paracrines appartenant aux familles des **FGF** ou des **WNT** sont sécrétés par les cellules du mésoderme et activent dans les cellules voisines l'expression de **Tbx5** au niveau des futurs membres antérieurs et **Tbx4** au niveau des futurs membres postérieurs.

L'effet de ces facteurs paracrines dépend des gènes déjà exprimés dans ces cellules compétentes, en particulier des gènes **homéotiques Hox**. Ces gènes appartiennent à une famille multigénique déterminant la **position** et l'**identité** des structures dans l'embryon. Ils codent pour des facteurs de transcriptions spécifiques capables de se lier à l'ADN au niveau d'un **homéodomaine**. Ces gènes sont fortement conservés au cours de l'évolution. Leur **patron** d'expression spatial et temporel est corrélé à leur position dans les complexes chromosomiques. Les gènes Hox sont exprimés dans l'embryon selon un axe antéro-postérieur, (et aussi selon un axe proximo-distal dans le bourgeon du membre). L'expression combinée de certains gènes hox au niveau du mésoderme est nécessaire pour activer l'expression de **Tbx5**, une autre combinaison est nécessaire pour activer **Tbx4**. Les gènes Tbx sont eux même des facteurs de transcriptions. Ils vont entre autres activer l'expression des gènes **Fgf** et **Wnt**.

Des cascades d'induction vont s'enchaîner au cours de la formation du membre :

Le **mésenchyme** du bourgeon induit (grâce à **FGF-10**) au niveau de l'ectoderme du bourgeon, une crête ectodermique apicale. Celle-ci va à son tour sécréter **FGF-8**. Ce message stimule l'expression de **fgf-10** au niveau du mésenchyme. Ce rétrocontrôle positif conduit à une prolifération des cellules et un gradient proximo-distal de **FGF10**. Les nouvelles cellules expriment selon un axe proximo-distal d'autres gènes Hox qui déterminent la position et l'identité des segments du membre. **FGF8** induit aussi un centre inducteur dans la partie postérieure du bourgeon : la **zone d'activité polarisante**. Cette région sécrète un autre facteur paracrine, **SHH**. Ce facteur présente un gradient antéro-postérieur et induit dans les cellules du mésenchyme la formation des différents segments du membre selon cet axe de polarité.

La formation du membre s'achève par des processus **d'apoptose** qui permettent par exemple de sculpter les doigts

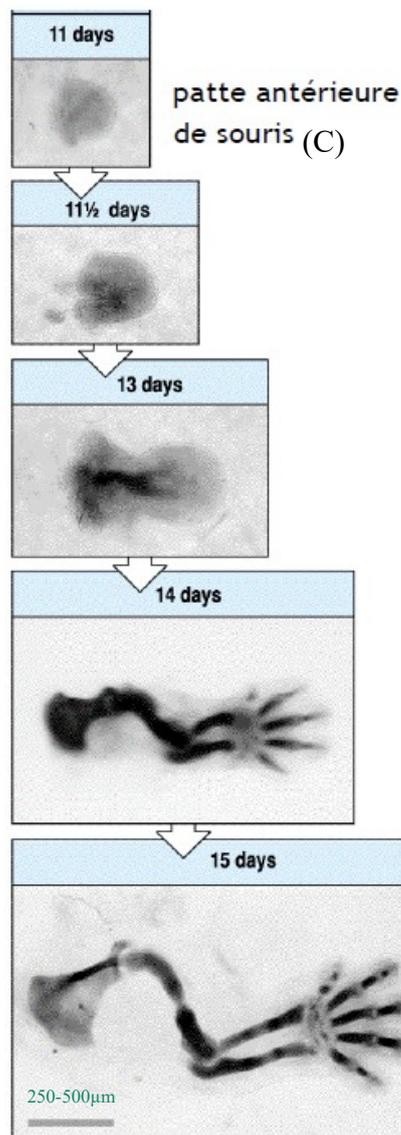
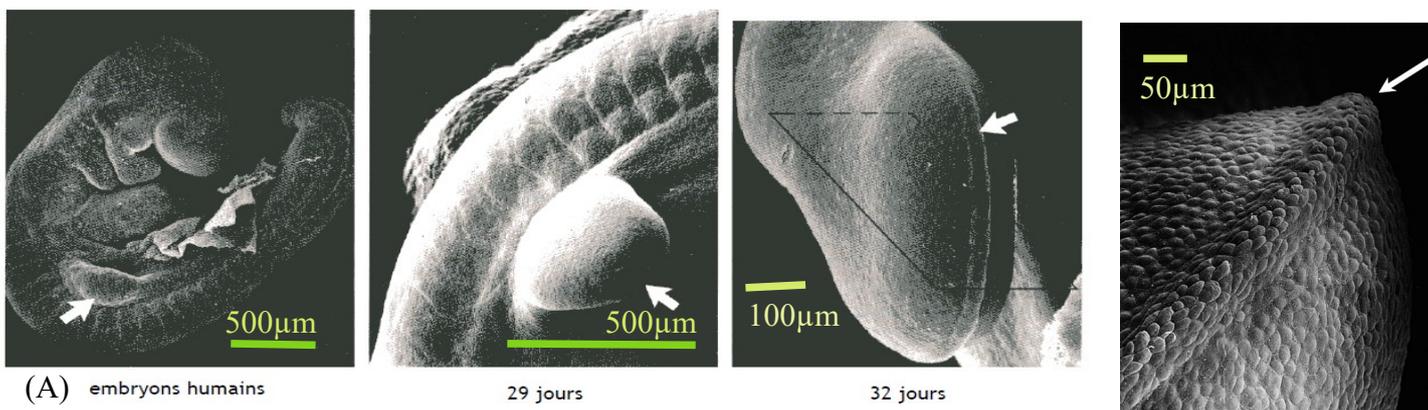
II. Développement du bourgeon du membre

On se demande comment les membres se positionnent selon l'axe antéro-postérieur, et comment ils s'organisent en différents segments selon l'axe proximo-distal.

Le développement du membre a été étudié chez les amphibiens dès 1915 (le membre se forme dans les 10 semaines qui suivent l'éclosion) mais il est principalement étudié aujourd'hui chez le **poulet** et la **souris**

A. Séquence de la mise en place du membre chirodien

Pendant l'organogénèse, des mitoses au niveau de l'ectoderme et de la somatopleure forment une protubérance, appelée **bourgeon**, à l'emplacement du futur membre. Puis un relief, la **crête apicale ectodermique** (Apical Ectodermic Ridge en anglais) se forme dans le plan frontal du bourgeon. Ensuite le bourgeon s'allonge, et les différents segments s'individualisent : le zygopode, puis le stylo-pode puis l'autopode. Enfin les doigts se forment.



- Modes d'observations :

(A) *MEB*

(B) *MO*

(C) *radiographie*

- légendez les flèches blanches

bourgeon de membre

puis crête ectodermique apicale

- proposez une échelle pour chaque photo

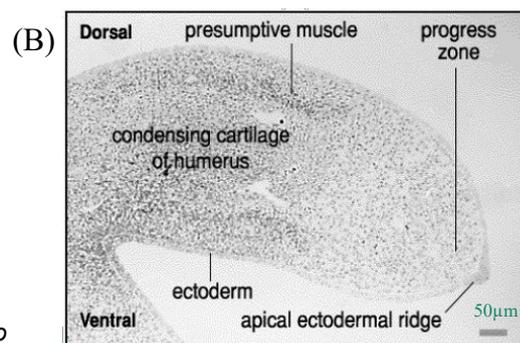
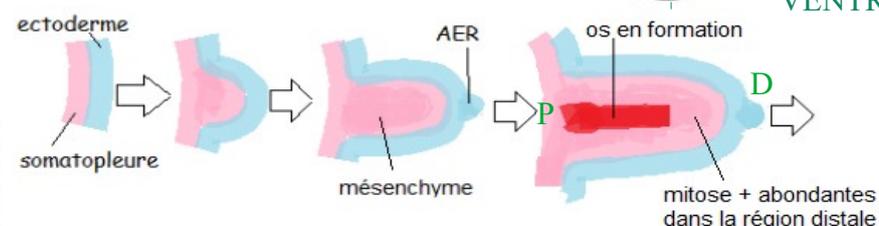


Schéma bilan
coupe transversale d'embryon pendant l'organogénèse et début de l'évolution du bourgeon d'un membre

-orientez
plan de symétrie bilatérale -----
P-D : axe proximo-distal



somatopleure : couche de mésoderme située contre l'endoderme dans les régions ventrales et latérales de l'embryon

mésenchyme : massif cellulaire issu des mitoses de la somatopleure, qui forme tous les tissus du membre à l'exception de l'épiderme, des cellules nerveuses et des cellules musculaires.

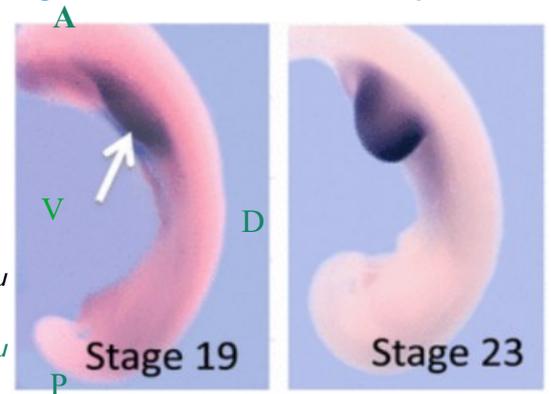
B- contrôle de l'initiation du bourgeon du membre

1-L'identité du bourgeon est associée à l'expression spécifique des gènes Tbx dans le mésenchyme

mise en évidence de l'expression spécifique d'un gène Tbx au début du développement du bourgeon du membre supérieur du poulet (flèche blanche)

- orientez l'embryon : Axes Antéro-Postérieur et Dorso-Ventral
- citer 2 ex de techniques permettant d'obtenir le résultat ci contre *hybridation in situ*, *gène rapporteur*,

- Comment démontrer que l'expression des gènes *tbx* est nécessaire au développement du bourgeon du membre (2 propositions)
inactivation de l'expression du gène par mutagenèse ciblée ou interférence à ARN



Les gènes Tbx s'expriment dans le mésenchyme lors de la formation du bourgeon du membre. Ils codent pour des **facteurs de transcription spécifiques**. Les protéines TBX possèdent donc un domaine de fixation à l'ADN et contrôlent l'expression d'autres gènes. TBX5 est exprimée dans le bourgeon du membre supérieur, TBX4 est elle exprimée dans le bourgeon du membre inférieur.

RQ noter la différence d'écriture entre un gène et une protéine.

Comment expliquer l'expression spécifique des gènes *tbx* au niveau du bourgeon du membre ?

2- Les gènes homéotiques *hox* contrôlent l'expression génétique selon un axe antéro-postérieur

i. présentation des gènes *hox*

Les gènes *hox*, initialement identifiés chez des mutants du développement des drosophiles, déterminent l'**identité** des différents segments de l'organisme (par ex la mutation d'un gène *hox* a généré une drosophile avec des pattes à la place des antennes)

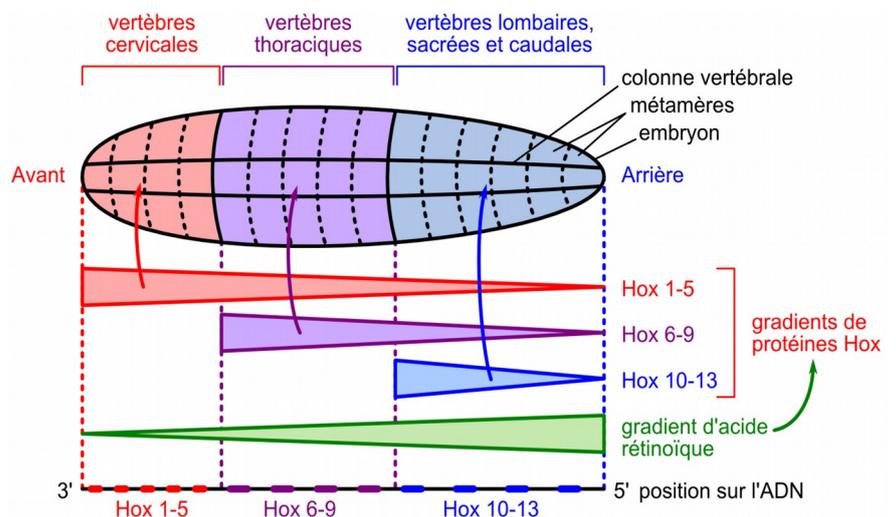
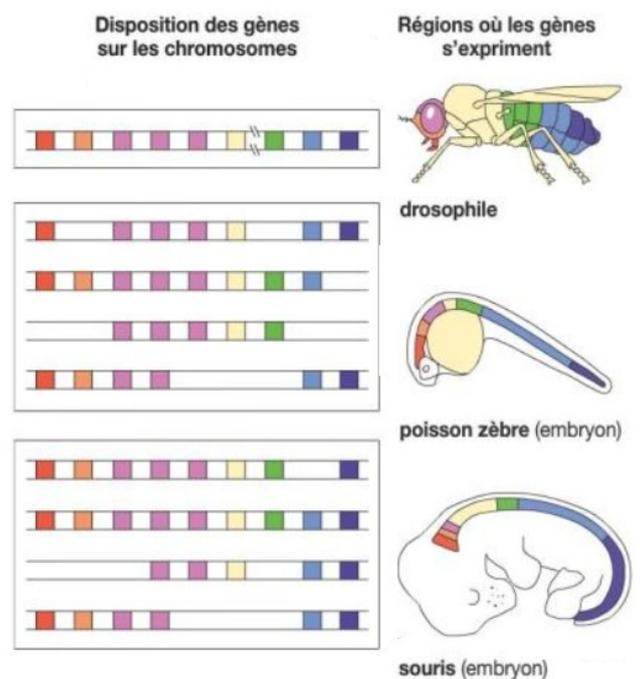
Ils forment une **famille multigénique** codant pour des **facteurs de transcription spécifiques**. Les protéines HOX possèdent un domaine de fixation à l'ADN particulier appelé **homéodomaine**.

Les gènes *hox* sont disposés en groupe (cluster) sur le chromosome. On retrouve des gènes homologues aux gènes Hox de drosophile chez tous les bilatériens, ce qui montre une forte conservation au cours de l'évolution.

RQ : Chez les vertébrés il existe 4 clusters (Hoxa à d). Ces clusters proviendraient d'un même cluster ancestral copié lors de 2 épisodes de polyploïdisation chez les ancêtres des vertébrés.

La disposition des gènes *hox* dans le cluster présente une originalité : elle correspond à l'ordre dans lequel ils commencent à s'exprimer au cours du développement, et à l'ordre des régions où ils s'expriment selon l'axe antéro-postérieur.

RQ : Le contrôle de l'expression des gènes *hox* fait encore l'objet d'études. Il serait lié à un gradient antéro-postérieur d'acide rétinoïque qui se met en place dans les stades précoces du développement.



ii Le patron d'expression des gènes hox contrôle l'identité et la position des membres

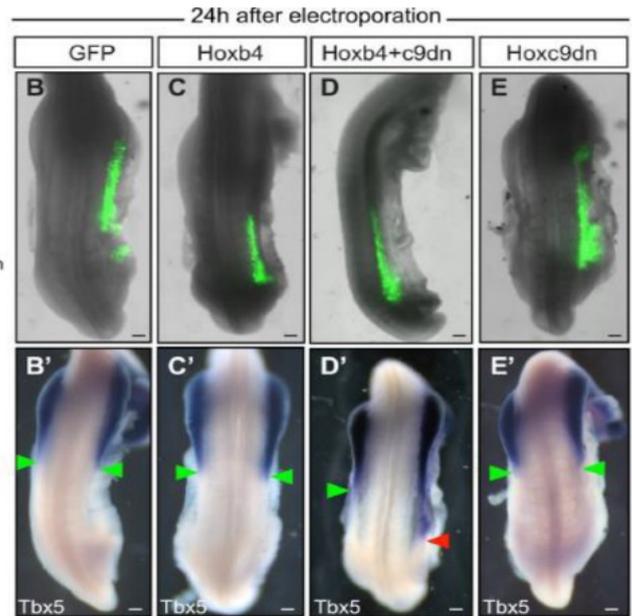
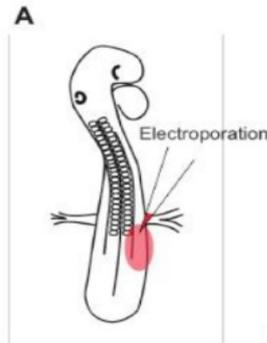
On observe chez de nombreux vertébrés que le membre antérieur se forme au niveau où le gène Hoxc6 commence à s'exprimer, c'est à dire au niveau de la première vertèbre thoracique. D'autres gènes Hox sont impliqués dans la formation des membres

-Mise en évidence du rôle des gènes Hox b4 et Hoxc9

RQ : Une électroporation permet de perméabiliser les membranes cellulaires afin de permettre la pénétration d'une protéine.

RQ : Hoxb4 s'exprime principalement dans la partie antérieure alors que Hoxc9 s'exprime dans la partie postérieure

Injection par électroporation dans un embryon de poulet de la GFP seule (B) ou accompagnée
- de transcrits de Hoxb4 (C)
- ou d'ARN antisens de Hoxc9 (E)
- ou un mélange des 2 précédents ARN (D)



On détecte après 24h :

Ligne 1 : la GFP (ligne 1)

Ligne 2 : par hybridation in situ l'expression de Tbx5

-intérêt de

l'injection de la GFP ? Localiser la zone d'injection

ne réaliser l'injection que d'un côté ? Témoin expression normale de Tbx5

-Analysez :

B+B'=> l'injection et la GFP n'ont pas d'effet sur l'expression de Tbx5

C+C'=> Hoxb4 seul ne stimule pas l'exp de Tbx5 dans la partie postérieure

E+E'=> les ARNantisens ne stimulent pas l'exp de Tbx5 dans la partie postérieure

D+D' + C+C' => Hoxc9 inhibe l'expression de Tbx5

D+D' + E+E'=> Hoxb4 stimule l'expression de Tbx5

RQ : Des études complémentaires permettent de conclure que les gènes hox 4à5 (qui s'expriment dans la région antérieure) stimulent l'expression de tbx5 donc la formation du membre supérieur, alors que les gènes hox 8à9 (qui s'expriment dans la région postérieure) l'inhibent. (et inversement pour le gène tbx4). Le gène hoxc6 qui s'exprime dans la région à cheval sur les 2 membres stimule l'expression de tbx5 et tbx4.

Bilan : Les protéines Hox produites dans les cellules mésodermiques déterminent la position et l'identité du membre en contrôlant l'expression des gènes tb5 et tbx4. **Nous allons voir que l'expression de ces gènes est aussi contrôlé par l'environnement cellulaire.**

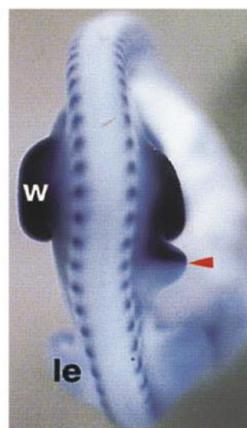
3-La formation du bourgeon est aussi contrôlée par des facteurs paracrines

Les FGF (Fibroblast Growth Factor) forment une famille de substances paracrines produites à différents stades du développement. Ce sont des facteurs de croissance qui stimulent entre autres les divisions cellulaires. Divers FGF sont présents dans le bourgeon du membre, dont FGF-10 et FGF-8

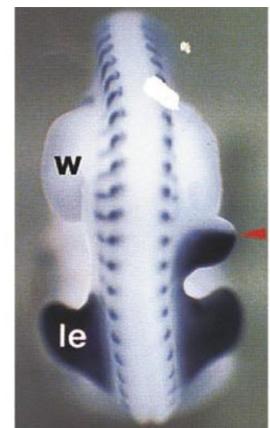
Mise en évidence de l'action de FGF-8

La photo présente la face dorsale d'un embryon de poulet. Une bille de FGF8 a été placée au contact de l'embryon au niveau de la flèche rouge puis retirée. (site ectopique = sans FGF normalement).

Quelques heures plus tard, on réalise 2 hybridations in situ : l'une avec une sonde de Tbx5, l'autre avec une sonde de Tbx4. (W= aile ; le=patte)



Expression de Tbx5 (Hybridation in situ)



Expression de Tbx4 (Hybridation in situ)

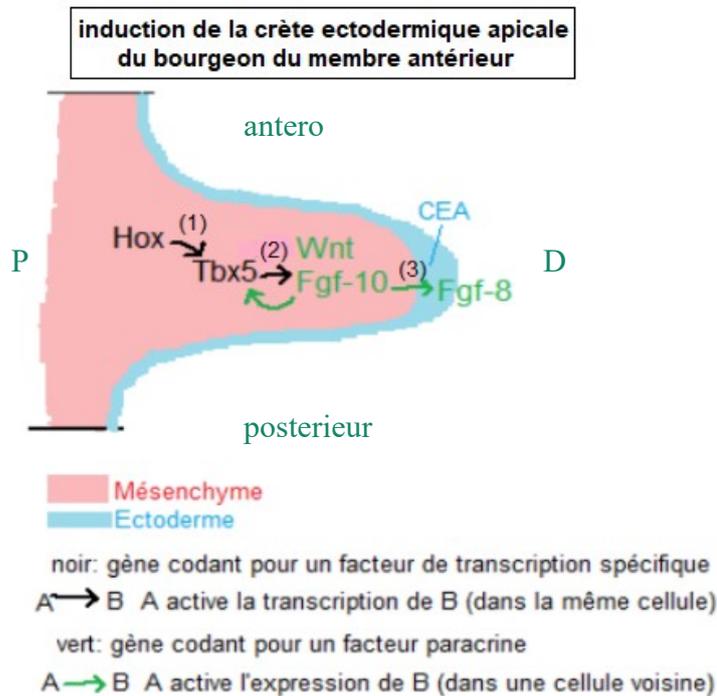
-Analysez : *apparition d'une protubérance => FGF stimule les mitoses et la formation du bourgeon.*

Expression de Tbx5 dans la partie sup => FGF stimule l'exp de Tbx5 dans la moitié sup

Exp de Tbx4 dans la partie inf=> FGF stimule l'exp de Tbx4 dans la moitié inf

Des études complémentaires ont permis de montrer que les gènes *tbx* sont contrôlés par divers facteurs paracrines : *FGF8*, *FGF10*, *Wnt*, ... Intéressons nous à présent aux conséquences de l'expression des gènes *tbx*.

4. La crête épidermique apicale est induite par des facteurs paracrines du mésenchyme



(1) Les cellules du mésenchyme au niveau du futur membre antérieur expriment des gènes **Hox** (dont *Hoxc6*, *hoxb4*,...). Ces facteurs de transcription spécifiques contrôlent l'expression de nombreuses protéines, dont certaines rendent les cellules compétentes pour répondre à certains facteurs paracrines (dont *Fgf-10*). En présence de ces facteurs, elles activent la transcription de **Tbx5**.

(2) **Tbx5** est un facteur de transcription spécifique activant l'expression de certains gènes dont **Wnt** et **Fgf-10** codant pour des facteurs paracrines qui stimulent dans les cellules mésodermiques voisines l'expression de **Tbx5**.

(3) Le facteur paracrine codé par *Fgf-10* induit aussi des cellules ectodermiques situées à l'apex du bourgeon : il y active l'expression d'un autre facteur paracrine : **Fgf-8**. Les protéines FGF sont des facteurs de croissance: elles stimulent les mitoses ce qui permet au bourgeon de grossir, et à l'ectoderme de s'épaissir localement, formant la **crête ectodermique apicale**.

RQ : un schéma équivalent peut être proposé dans le membre postérieur avec l'expression du gène *Tbx4* contrôlé par les gènes *Hoxc6* et *Hoxc9*.

- orientez le schéma : axe antéro-postérieur, axe proximo-distal.

-Proposez une expérience pour montrer que *Fgf-8* est exprimé uniquement par les cellules ectodermiques.

Hybridation in situ de *Fgf-8*, ou gène rapporteur

Généralisation de la notion d'induction

Cet exemple illustre un processus important du développement embryonnaire : l'**induction**.

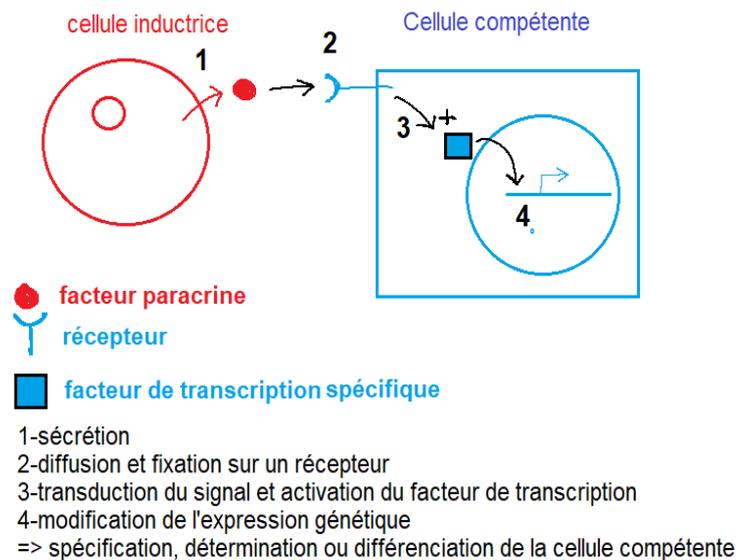
On qualifie d'**induction** l'entrée de cellules dans une voie de développement particulière, sous le contrôle d'autres cellules.

L'induction fait intervenir des **signaux paracrines** qui sont reconnus par les **récepteurs** des cellules compétentes. Les récepteurs contrôlent l'activité de **facteurs de transcription spécifiques (FTS)** et modifient ainsi l'expression génétique des cellules.

La réponse de la cellule cible dépend

- de la concentration des signaux paracrines
- des récepteurs et des FTS qu'elle exprime.

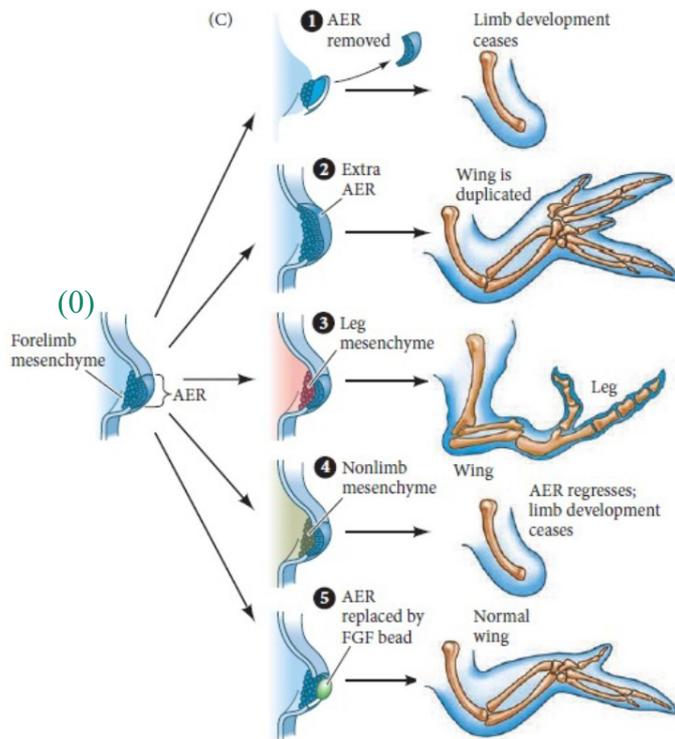
Principe de l'induction embryonnaire



Une fois le bourgeon du membre mis en place avec sa crête ectodermique apicale, nous allons voir que de nouvelles cascades d'induction se produisent et permettent l'élongation du bourgeon et sa structuration en 3 segments

C. Contrôle de l'élongation du bourgeon

1-la crête ectodermique apicale contrôle le développement du bourgeon



Différentes manipulations sont réalisées au niveau du bourgeon d'un membre supérieur de poulet (aile=Wing).

1-ablation de la crête ectodermique apicale (AER en anglais)

Greffes ectopique.

2-d'un AER supplémentaire à côté de l'AER normal

3-d'un mésenchyme de membre inférieur sous l'AER

4-d'un mésenchyme n'appartenant pas à un bourgeon de membre

5-remplacement de AER par une bille de FGF

identifier les manipulations qui montrent que :

(1)+(0) => AER est nécessaire au développement du bourgeon
(0) est un témoin positif permettant de vérifier le dev normal du membre

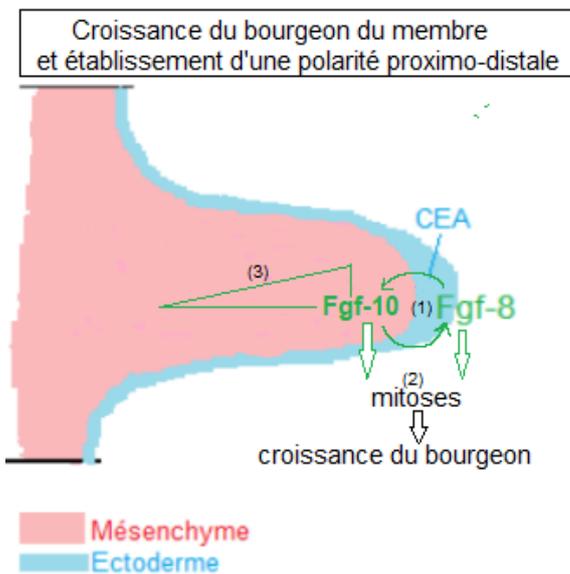
(1)+(0) +(5) => AER contrôle le développement du bourgeon grâce à une communication paracrine.

(1) est un témoin négatif vérifiant l'abs de développement sans FGF

(0)+(4) => le mésenchyme du bourgeon est nécessaire au fonctionnement de AER

(0)+(3) => le mésenchyme du bourgeon détermine l'identité du membre

2- Un rétrocontrôle positif provoque une prolifération des cellules distales et une polarisation proximo-distale



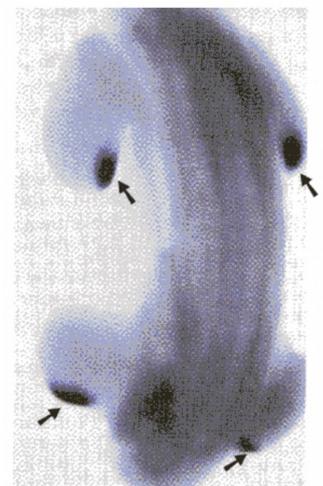
(1) FGF-8 produit par les cellules de la crête ectodermique apicale stimule la sécrétion de FGF-10 par les cellules du mésenchyme, qui à son tour amplifie la sécrétion de FGF-8.

(2) FGF-8 et FGF-10 stimulent les mitoses à l'extrémité du bourgeon, ce qui permet son élongation

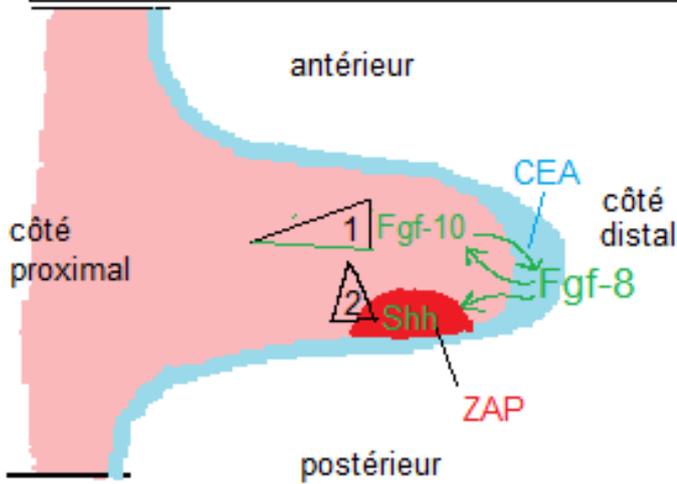
(3) FGF-10 diffuse dans le bourgeon, ce qui forme un gradient de concentration. Ce gradient permet d'établir une polarité et informe ainsi les cellules du mésenchyme sur leur position sur l'axe proximo-distal. (Plus une cellule du mésenchyme est éloignée du côté proximal, plus la concentration en FGF-10 dans son environnement est importante)

3-La crête ectodermique apicale induit la formation d'un nouveau centre inducteur : la zone d'activité polarisante

Au cours de la croissance du bourgeon, se met en place une **polarité antéro-postérieure** qui peut être mise en évidence grâce à l'expression du gène *Shh* dans la partie postérieure du bourgeon =>



Induction de la zone d'activité polarisante par la crête ectodermique apicale



- 1- gradient proximo-distal de FGF
- 2- gradient antéro-postérieur de SHH

FgF-8 induit dans la partie postérieure du mésenchyme l'expression de certains gènes comme **Shh**. Cette région a été nommée zone d'activité polarisante (ZAP) : elle sécrète en particulier le facteur paracrine SHH. Un gradient antéro-postérieur de SHH peut ainsi se mettre en place.

SHH induit ensuite les autres cellules du mésenchyme en activant les programmes génétiques associés aux régions postérieures du membre.

Bilan : L'apex du mésenchyme du bourgeon induit la formation de la crête ectodermique apicale qui induit à son tour la ZAP : ces trois régions sont appelées des centres inducteurs.

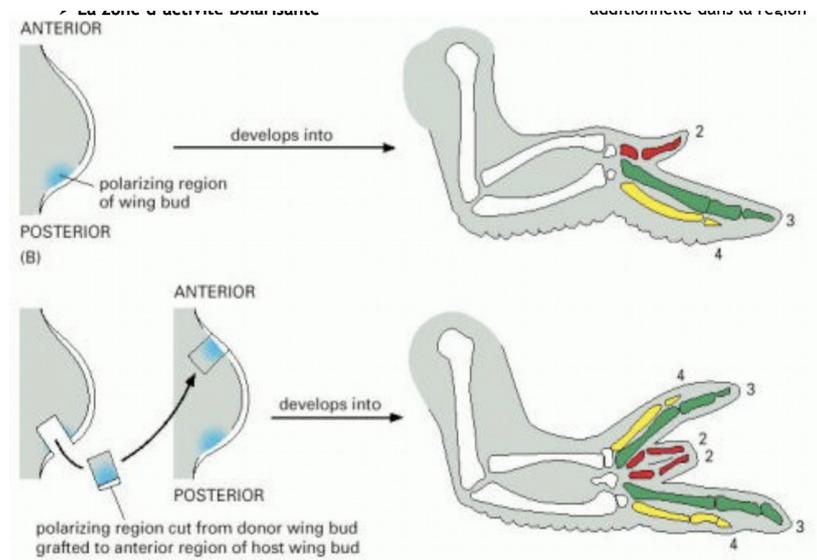
4-La ZPA a un rôle morphogène

Mise en évidence :

On réalise une greffe ectopique d'une ZPA sur un bourgeon de membre antérieur de poulet. Le bourgeon possède ainsi deux ZPA : une en position postérieure et une en position antérieure.

L'aile qui se développe présente des os surnuméraires au niveau de la main, indiquant que la ZPA a induit la formation de nouveaux organes.

Par ailleurs la partie antérieure de l'aile a une polarité inversée par rapport à la partie postérieure, ce qui confirme le rôle de la ZPA dans la polarisation antéro-postérieur du memb



RQ : un dernier axe de polarité dorso-ventral se met aussi en place.

Mise en évidence : Lmx1b est un mutant Wnt7 KO de souris.

Wnt 7s'exprime au niveau de l'ectoderme dorsal du bourgeon de membre.

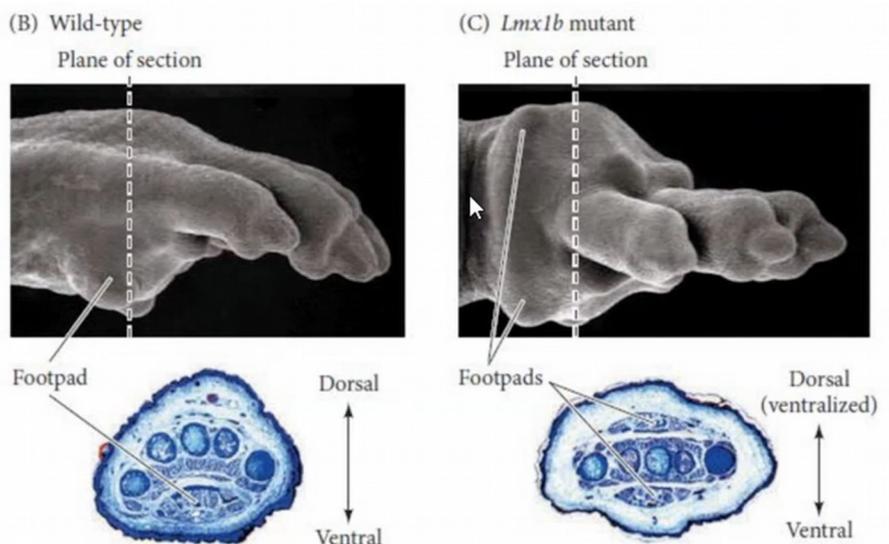
On s'intéresse plus particulièrement au segment terminal (autopode)

Footpads : coussinet, formé de tissu adipeux sous cutané.

-Légendez la coupe :

ectoderme, os des doigts, mesenchyme

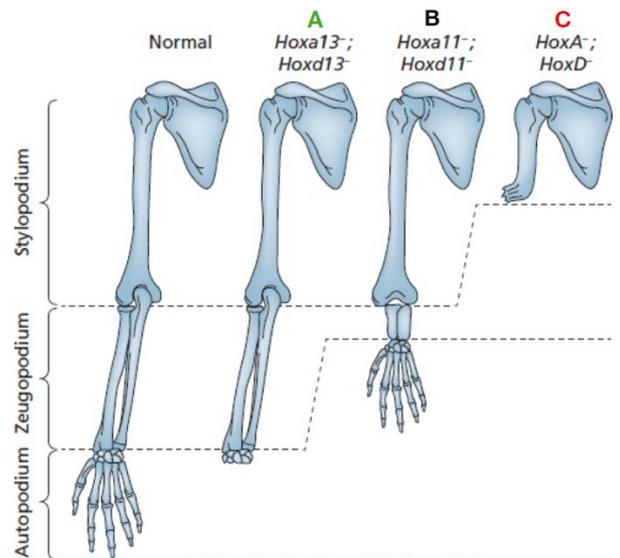
-Montrer que Wnt7 contrôle la polarité dorsoventrale de la main en abs de Wnt7 la main présente deux faces ventrales donc Wnt7 stimule la dorsalisation (ou inhibe la ventralisation) de la main.



3-Les gènes Hoxd déterminent l'identité et la position des différents segments selon l'axe proximo-distal et antéro-postérieur

Mise en évidence des gènes Hox dans la mise en place des segments du membre antérieur :

Membre antérieur formé après Invalidation de gènes Hox13 (A), ou de gènes Hox 11 (B) ou des clusters HoxA et D (C) ou d'une mutation dans le gène Hoxd13 (photo)



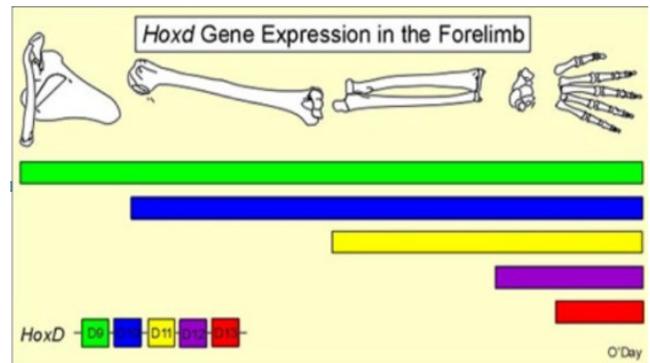
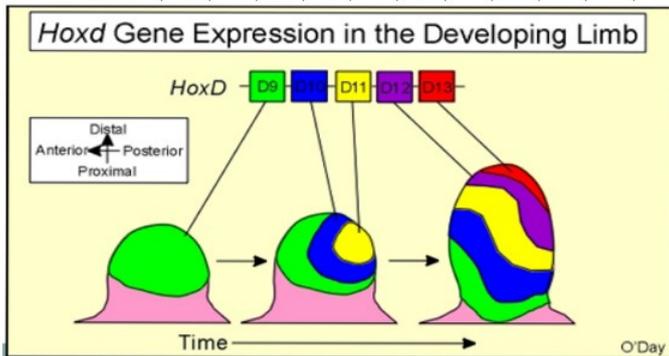
Membres antérieur d'un humain portant une mutation HOXD13 (C)



D'après DEVELOPMENTAL BIOLOGY (2018) Scott Gilbert – SINAUER

-Analysez normal + HoxA&D => Hox nécessaires aux dev du membre antérieur
 normal+ A => Hox13 nécessaire au dev de la main uniquement
 normal +B=> Hox11 nécessaire au dev du zygapode uniquement

Bilan : On a vu que les gènes Hox s'expriment selon un axe antéro-postérieur. Certains peuvent aussi s'exprimer selon un axe proximodistal.



Par ex le stylopoide se met en place dans la partie proximale où Hoxd9 et Hoxd10 s'expriment, alors que l'autopode se met en place dans la partie distale où les gènes Hox9 à 13 s'expriment.

BILAN : Le devenir d'une cellule du mésenchyme dépend de sa position dans le bourgeon, position signalée par la concentration de facteurs paracrines comme FGF, SHH, WNT mais aussi des gènes Hox qu'elle exprime.

D. L'apoptose permet de sculpter les doigts

L'apoptose est un programme génétique de mort cellulaire programmé. Ce programme permet de finaliser la formation du membre (mais intervient aussi à diverses autres étapes du développement)



Apoptose partielle n'ayant pas permis la séparation de 2 doigts

