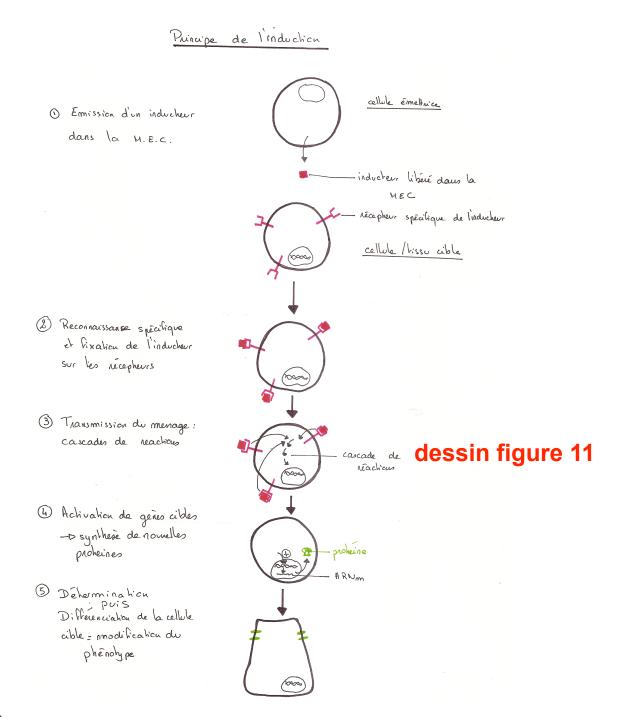
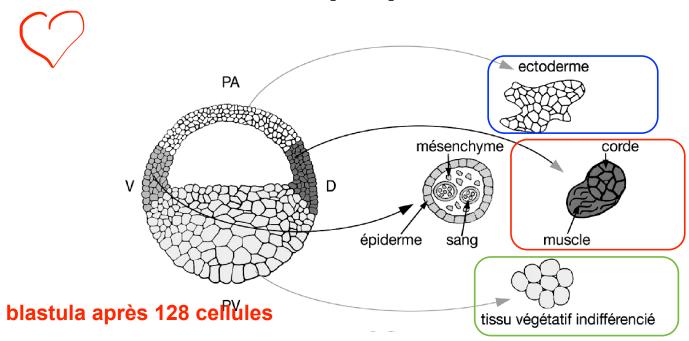
Figure 1 : principe de l'induction



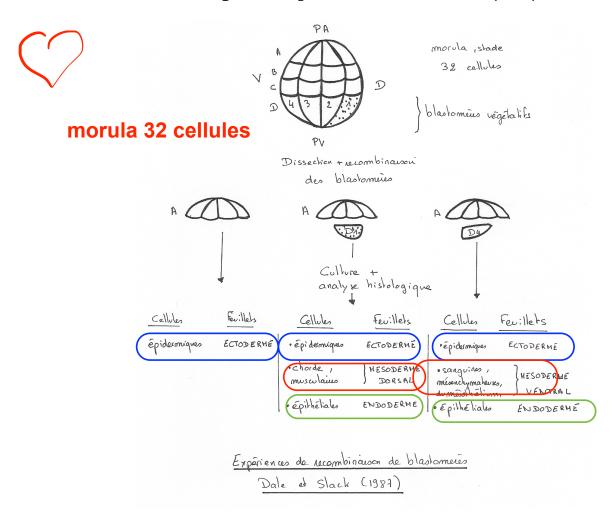
- 1. Émission d'un **signal inducteur = inducteur moléculaire** par un tissu donné et à un moment donné du DE, et **diffusion** dans le **milieu extracellulaire**.
- 2. **Reconnaissance spécifique** de l'inducteur moléculaire par les récepteurs spécifiques portés par les **cellules cibles** (interaction récepteur messager). Le signal inducteur n'agit que sur les **cellules compétentes** à cette induction = cellules exprimant le récepteur du signal = cellules pouvant être induites.
- 3. **Transduction** du message dans la cellule cible = <u>trans</u>mission + tra<u>duction</u> = cascade de réactions conduisant à une réponse de la cellule cible. La transduction d'un inducteur moléculaire conduit au **contrôle de la transcription** de plusieurs gènes.
- 4. **Réponse** = le contrôle de la transcription est responsable de **l'engagement de la cellule cible** dans une voie de différenciation donnée = DETERMINATION (= re-programmation génétique des cellules cibles) qui engage la cellule dans une voie de DIFFERENCIATION.

Figure 2 : expérience de Nieuwkoop : mise en évidence des territoires présomptifs de la blastula



Mésenchyme = tissu embryonnaire lâche pouvant se différencier en tout type de tissu conjonctif et en épithélium.

Figure 3 : expérience de Dale et Slack (1987)



BCPST1, Lycée Hoche

Figure 4 : expérience de Gimlich (1984, 1986) : Induction dorsalisante du mésoderme par le centre de Nieuwkoop

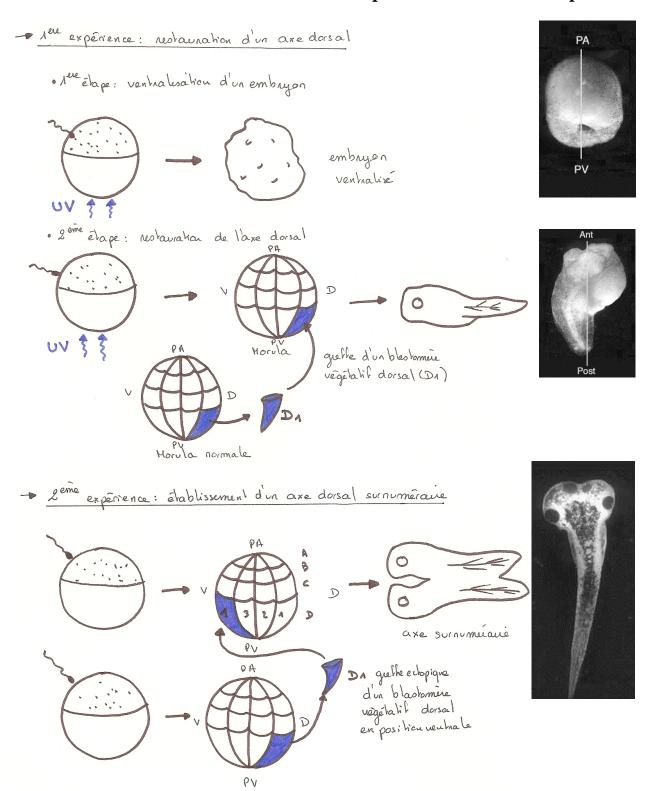
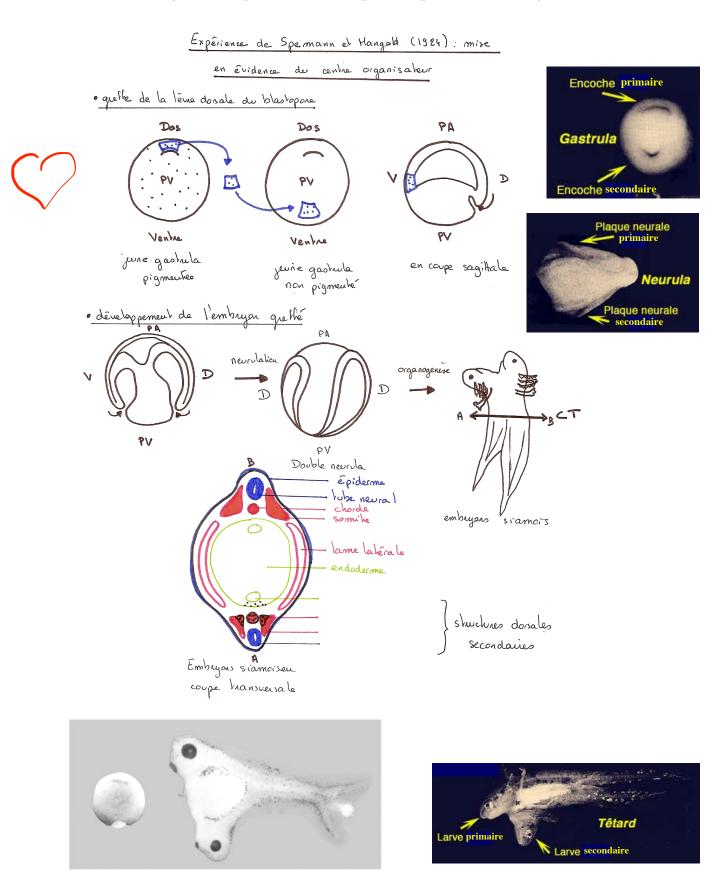


Figure 5 : expérience historique de Spemann et Mangold (1924)



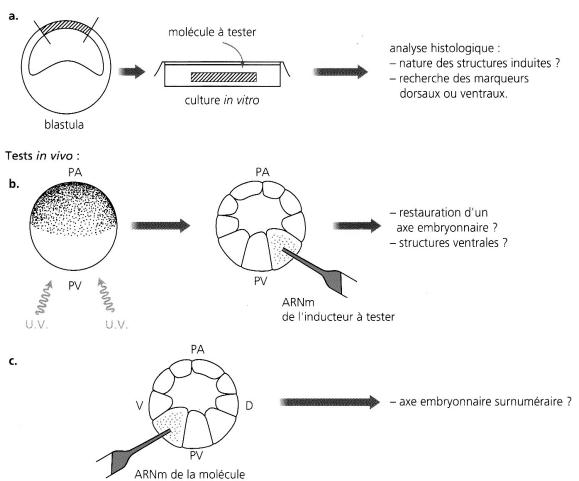
Copyright © 2006 Nature Publishing Group Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 6 : représentation schématique des tests réalisés in vivo et in vitro

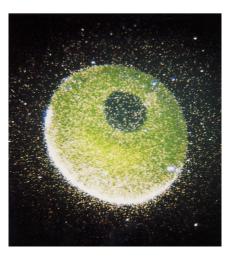
permettant de rechercher les inducteurs du mésoderme.

(in Darribère, Belin 2002)

Test in vitro



à tester



BCPST1, Lycée Hoche



Figure 7 : Schéma bilan : induction et structuration du mésoderme

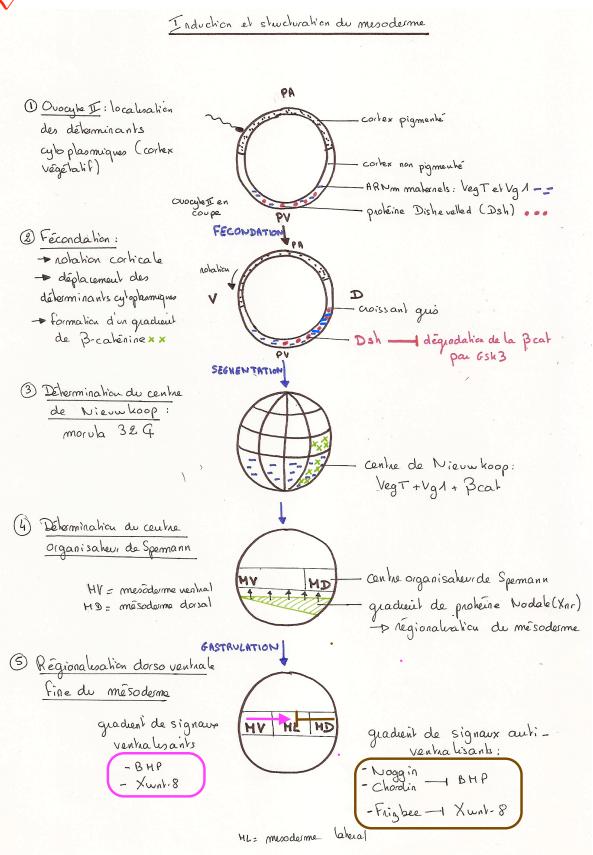


Figure 8a : VegT active l'expression de Xnr1 (Hyde et Old, 2000)

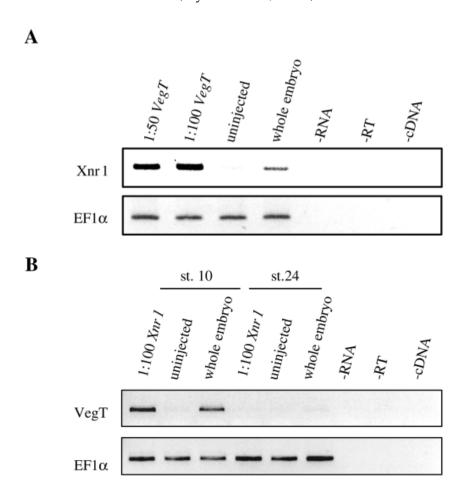


Fig. 2. Mutual induction of Xnr1 and VegT. (A) VegT can induce expression of Xnr1 in ectodermal cells. (B) Xnr1 can induce expression of VegT in ectodermal cells. Approximately 200 pg (1:50 dilution) and 100 pg (1:100 dilution) of VegT mRNA or Xnr1 mRNA was injected into the animal pole of 1-cell Xenopus embryos. Animal caps were dissected at stage 9, and harvested at stage 11 for the VegT-injected embryos, and at stages 10 and 24 for the Xnr1-injected embryos. Expression of Xnr1 and VegT was analysed by RT-PCR. The housekeeping gene $EF1\alpha$ is a loading control.

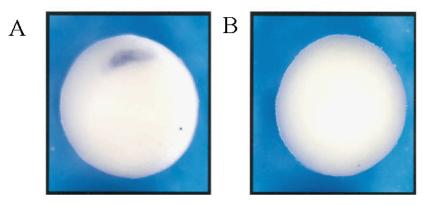
Site de fixation de Vegt1 au niveau du promoteur de Xnr1

Le promoteur de Xnr1 présente deux T box : VegT se fixe uniquement à la séquence TBX1.

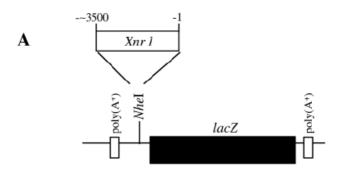
TBX1 TBX2

Xnr1 CATAGGTGTGAA...AGCTCACTCCTA

Figure 8b : Etude de l'expression de Nodal (Xnr) par hybridation *in situ* et par utilisation d'un gène rapporteur



Hybridation in situ utilisant une sonde anti sens (A) spécifique de Xnr-4, une sonde sens (B) en témoin négatif. L'embryon au stade gastrula est vu depuis l'hémisphère végétatif, avec la lèvre dorsale du blastopore en haut. (in Joseph et Melton, Developmental Biology, 186, 1997)



C

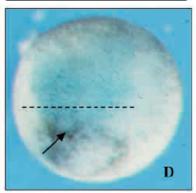
Embryon trasngéniques Xnr1.

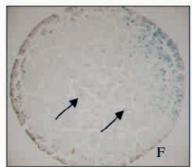
A: construction du gène rapporteur utilisé: le gène Lac-Z (ORF de la ß-galactosidase) est placé sous le contrôle des séquences (3,5kb) du promoteur du gène Xnr1.

C, D: embryons transgéniques au stade 10,25 (gastrula) exprimant le transgène Xnr1::lacZ. La coloration révèle une activité β-galactosidase dans la zone marginale dorsale.

La flèche indique la lèvre dorsale du blastopore, le trait en tirets (en D), le plan de coupe de la figure F. F: coupe de l'embryon présenté en D: le transgène est exprimé dans les noyaux des cellules de toutes les couches de l'Organisateur.

(in Hyde et Old., Development, 2000).

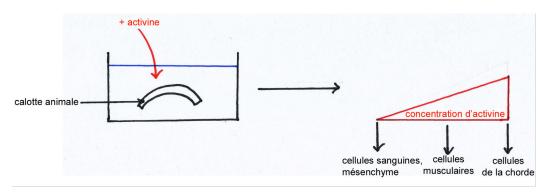


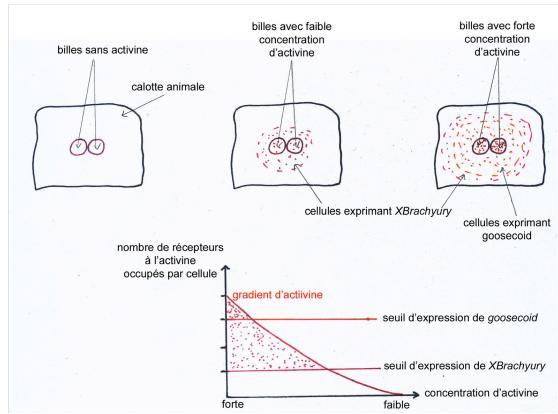


BCPST1, Lycée Hoche

Figure 9 : Mise en évidence de l'activité morphogène des facteurs TGFβ de type activines

De nombreuses expériences ont été réalisées avec les activines. Les cultures in vitro montrent ainsi des effets distincts selon la concentration du facteur sur la détermination des cellules et sur l'expression de gènes spécifiques du mésoderme.

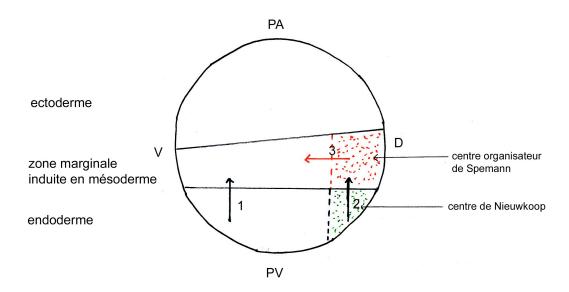




- A) Test in vitro sur des calottes animales cultivées en présence de différentes concentrations d'activine.
- (B) Test *in vitro* sur un tapis de cellules animales. Des billes (ou microsphères) contenant de l'activine (ou pas dans le cas du contrôle) sont déposées sur un tapis de cellules animales. L'expression d'ARNm spécifique du mésoderme est analysée par hybridation *in situ*. Les limites des domaines d'expression sont notées dans les différentes situations.

Le graphique récapitule les relations entre concentration d'activine, récepteurs occupés par l'activine et seuil d'expression des gènes considérés.

Figure 10 : Schéma bilan : Modèle d'induction et de régionalisation mésodermique à trois signaux



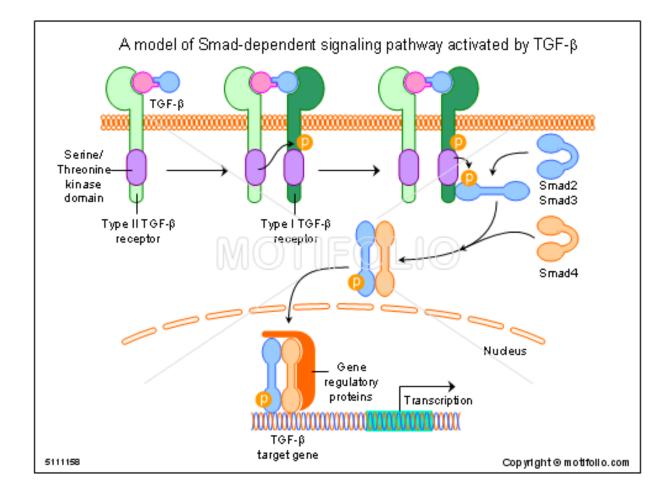
Les signaux de type 1 et 2 sont émis précocement, à partir du stade 32 cellules, et se maintiennent pendant la segmentation. Ils induisent les blastomères équatoriaux à former le territoire mésodermique. En outre, ces signaux polarisent le territoire mésodermique selon l'axe dorso-ventral. Les signaux de type 2, notamment inducteurs du centre organisateur de Spemann, sont émis à partir d'un domaine particulier de l'hémisphère végétatif, le centre de Nieuwkoop. Ce dernier constitue un centre inducteur impliqué dans la polarité dorso-ventrale de l'embryon. Plus tardivement en fin de segmentation et au cours de la gastrulation, les signaux de type 3 sont émis par le centre organisateur de Spemann et permettent la dorsalisation du mésoderme dans la bande équatoriale de la blastula. Ces signaux maintiennent la polarité du mésoderme et définissent des domaines mésodermiques encore plus précis (mésoderme latéral) selon l'axe dorso-ventral.

Notion de morphogène (Wolpert)

Un morphogène est défini comme une molécule de signal qui agit directement sur les cellules et dont la concentration détermine l'intensité de l'effet.

- Les **morphogènes** sont des signaux « longue-distance »
- Leur concentration décroît le long d'un segment donné, à partir du point d'émission
- Leur concentration en un point donné est caractéristique de sa position sur le segment
- Les effets des morphogènes varient en fonction de leur concentration
- Les cellules répondent à des valeurs seuils de morphogène qui sont des valeurs de position (activation de certains gènes)
- L'interprétation de ces valeurs est déterminée par l'histoire des cellules

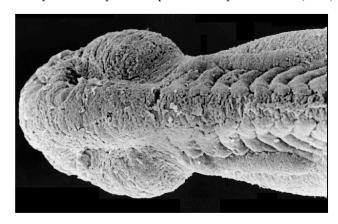
Figure 11 : voie de signalisation des TGFß

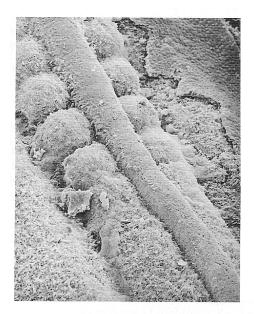


Chapitre II.D.2

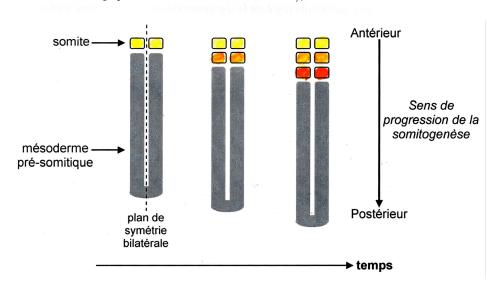
Figure 12 : Somites observés au MEB

(in Gilbert, De Boeck, 2004) Embryon de Xénope dont l'épiderme a été pelé sur le dos (MEB)





Le tube neural et quelques somites ; photographie prise au microscope électronique à balayage. Une fois récliné l'ectoderme de surface on peut voir des somites bien individualisés, et le mésoderme para-axial (en bas à droite), non encore métamérisé. Un renflement du mésoderme (en bas, à gauche) est un somitomère. On distingue même des cellules des crêtes neurales migrant en direction ventrale à partir du toit du tube neural. (Photographie avec l'autorisation de K. W. Tosney).



BCPST1, Lycée Hoche

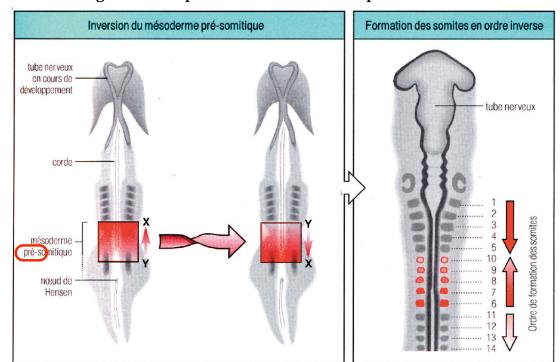
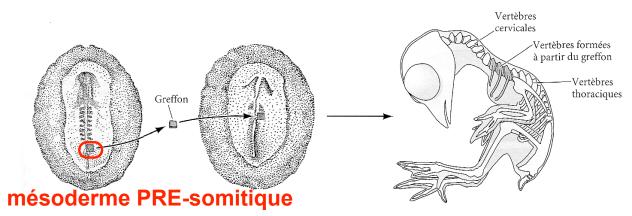


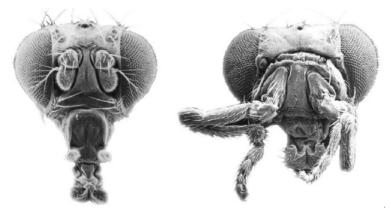
Figure 13a: expérience d'inversion (d'après B. Anselme)

Figure 13b : mise en évidence d'une identité de position par une expérience de greffe. (in Gilbert, De Boeck, 2004)



Le sort d'une partie donnée du mésoderme de la plaque segmentaire est déjà défini par sa situation le long de l'axe antéro-postérieur, avant même le début de la somitogenèse. On prélève une petite partie du mésoderme de la plaque segmentaire, normalement destinée à devenir des somites thoraciques. Ce greffon est ensuite transplanté derrière le premier somite d'un embryon plus jeune, dans la future région cervicale. On constate que le greffon se différencie en fonction de sa position originelle dans l'embryon, puisqu'il fait apparaître des côtes dans le cou. Noter que seul le côté du receveur est affecté. (D'après Kieny et al. 1972).

Figure 14 : Découverte des gènes homéotiques chez la Drosophile (Insecte, Arthropodes)

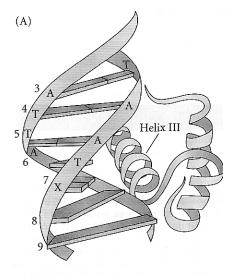


Une mutation du seul gène *Antennapaedia* (ci-dessus) entraîne la formation d'une paire de pattes (à droite) en lieu et place d'une paire d'antennes (phénotype normal à gauche). Une mutation du seul gène *Bithorax* (ci-dessous) entraîne la mise en place d'une seconde paire d'ailes (= comme s'il y avait deux thorax) sur le second segment thoracique qui n'en porte normalement pas.

Ces deux gènes sont des gènes homéotiques qui gouvernent tout un ensemble de caractères et qui sont responsables de l'identité de position des cellules et tissus.



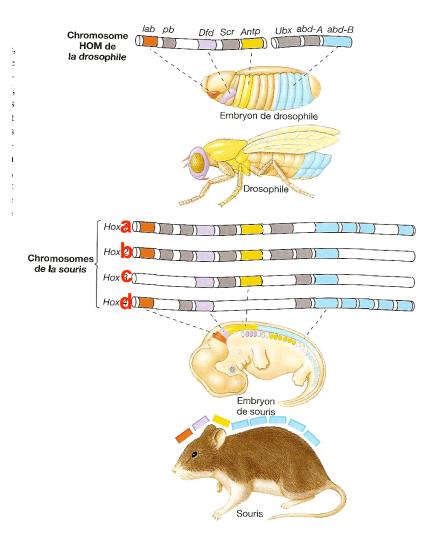
Figure 15 : Interaction entre l'homéodomaine et l'ADN (in Gilbert, De Boeck, 2004)



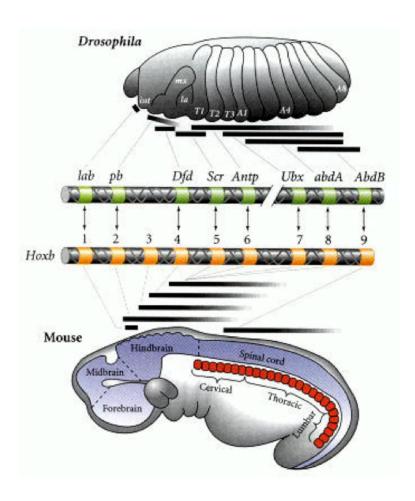
Interactions entre l'homéodomaine et l'ADN. (A) La séquence hélice-tourhélice de l'homéodomaine se trouve dans le grand sillon de l'ADN.

Figure 16: complexes HOM et HOX

(in Raven et al., De Boeck)



Comparaison du groupe de gènes homéotiques chez la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, et la souris, *Mus musculus*. Des gènes semblables, les gènes HOM de la drosophile et les gènes *Hox* de la souris, contrôlent le développement des parties frontales et postérieures du corps. Ces gènes sont situés sur le même chromosome de l'insecte et sur quatre chromosomes différents des mammifères. Sur cette figure, les gènes sont colorés comme les parties du corps où ils s'expriment.



BCPST1, Lycée Hoche

Figure 17 : Expression des gènes Hox b chez l'embryon de Souris après la neurulation :

Vues latérales d'embryons de 3 souris transgéniques 9,5 jours après la fécondation.

Gène de fusion : promoteur d'un gène Hox couplé au gène rapporteur lacZ.

LacZ s'exprime dans les cellules où s'exprime normalement le gène Hox.

L'activité β**-galactosidase** est détectée par la transformation d'un substrat Xgal (ajouté dans le milieu par l'expérimentateur) en **produit coloré bleu** (détection histochimique).

Schéma de la construction utilisée :

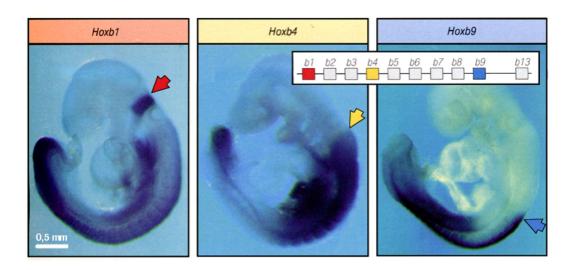


Figure 18 : expression des gènes des 4 complexes Hox le long de l'axe A/P du mésoderme de souris (d'après B. Anselme)

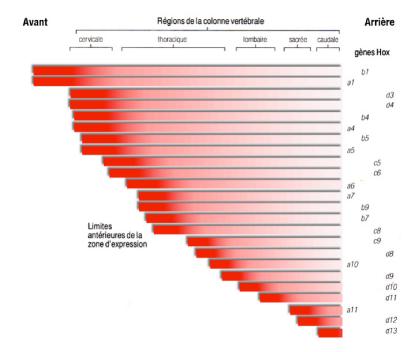
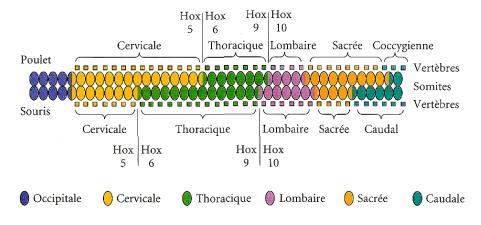
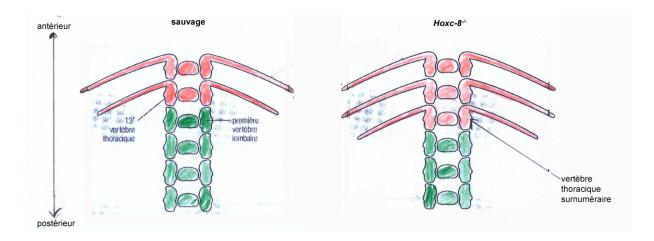


Figure 19a : domaines d'expression des gènes Hox dans les vertèbres de souris (à titre de document!) (in Gilbert, De Boeck, 2004)



Représentation schématique de l'organisation des vertèbres chez la souris et le poulet le long de l'axe antéro-postérieur. Les limites d'expression de certains groupes de paralogues du gène Hox ont également été indiquées. (D'après Burke *et al.* 1995.)

Figure 19b : Analyses comparées des phénotypes des vertèbres des souris sauvages et des souris knock-out *Hox c8*



Chez la souris, la limite antérieure d'expression du gène *Hoxc-8* correspond aux somites formant les vertèbres thoraciques. Des souris *knock-out* pour le gène *Hoxc-8* sont générées. Les embryons se développent jusqu'au terme ; les souriceaux meurent quelques jours après la naissance. Des défauts sont constatés entre la 7e vertèbre thoracique et la première vertèbre lombaire. Parmi les plus fréquents, on constate la présence d'une 14e paire de côte sur la lère vertèbre lombaire qui normalement n'en présente pas. **L'invalidation génique d'un gène** *Hox* entraîne un défaut dans le patron antéro- postérieur de développement. Il y a changement d'identité d'un segment, il s'agit donc bien d'une mutation homéotique. La lère vertèbre lombaire présente une identité identique à la 13e et dernière vertèbre thoracique qui lui est adjacente. Le changement homéotique correspond à une antériorisation des structures.

Figure 20 : contrôle de l'expression génétique par les gènes Hox

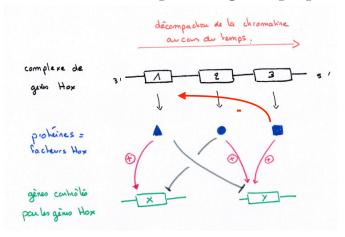


Figure 21 : Du myoblaste au myotube

Myoblastes au MO à contraste de phase



Myotubes au MO à contraste de phase

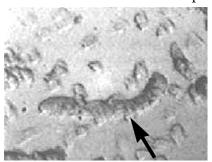
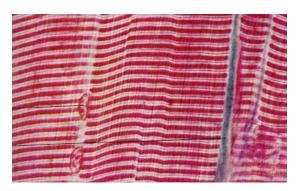
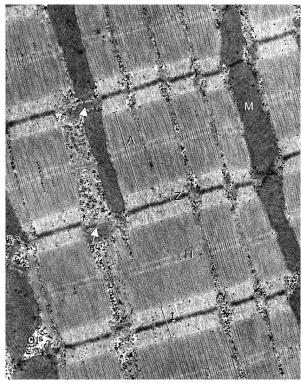


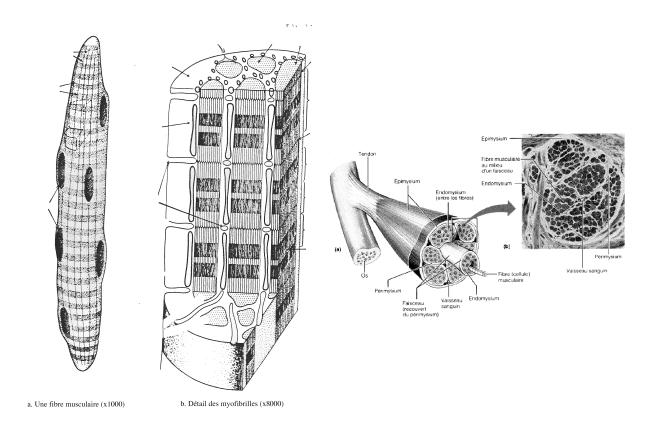
Figure 22 : Le myotube se différencie en myocyte = fibre musculaire

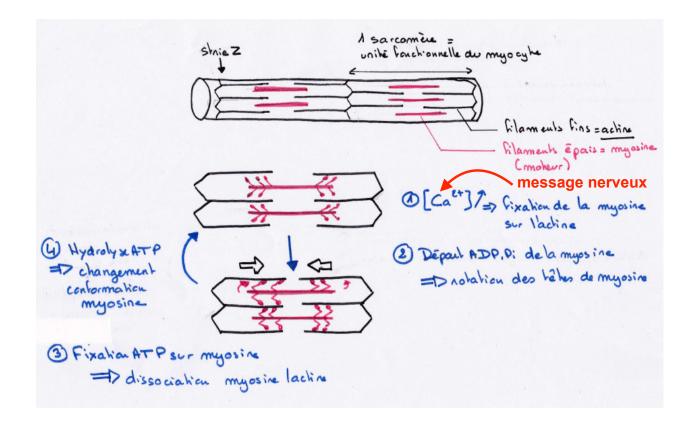
Coupe histologique de muscle au MO en coupe longitudinale



Myocyte au MET







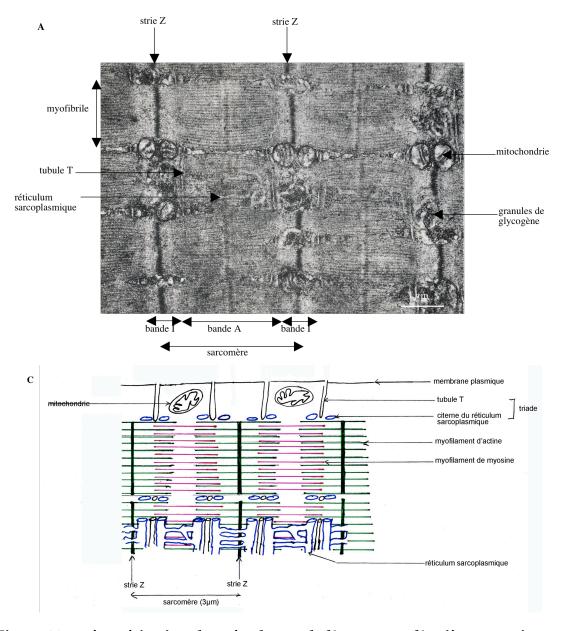


Figure 23 : métamérisation du mésoderme de l'avant vers l'arrière = somitogenèse

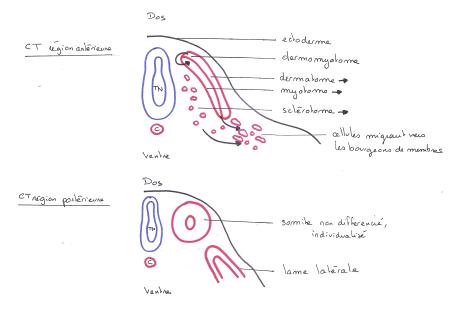


Figure 24 : les étapes de la différenciation de la cellule musculaire

Schêma bilan: Formation des cellules muscularies etricés eque lettiques cellules du mésodeme somitique 1 Dehermination **FGF** migration 3 Alignement, auch des divisions 4 Fusion 5 Différenciation myocyte = fibre musalance différencies **MyoD**

Myf5

(actine, myosine, tropomyosine...)

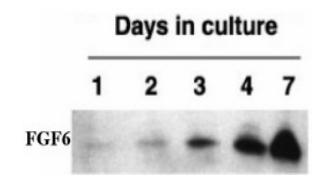
Figure 25 : FGF active la multiplication des prémyoblastes et inhibe leur différenciation

<u>Expérience</u>: étudier l'effet de FGF6 sur la lignée cellulaire musculaire C2C12 (qui ne l'exprime pas normalement).

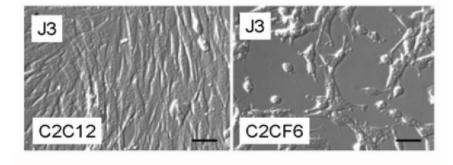
On fait s'exprimer FGF6 dans la lignée en transfectant (= en introduisant dans les cellules) le gène codant pour FGF6.

Résultat : on obtient une nouvelle lignée cellulaire, C2CF6.

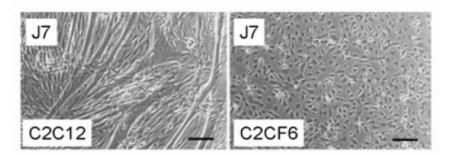
On vérifie que les cellules de la lignée C2CF6 produisent bien du FGF6 par mesure de FGF6 dans le milieu de culture des cellules (Western Blot).



Analyse morphologique des cellules :



Observations



Observations

Interprétation / Bilan :

Figure 26 : Mise en évidence de la fusion des myoblastes

On utilise deux population de myoblastes, dont on suit l'évolution par immuno fluorescence. La protéine suivie est une enzyme formée de deux sous unités identiques. Il existe des sous-unités A et B. On utilise 2 populations de myoblastes :

- une population exprimant la **sous unité A** (génotype A/A): cette sous-unité est réconnue de manière spécifique par un anticorps qui fluoresce dans le **vert**
- une population exprimant la **sous unité B** (génotype B/B) : cette sous-unité est réconnue de manière spécifique par un anticorps qui fluoresce dans le **rouge**

<u>Dessin des myoblastes au début de l'expérience</u>

Les cellules sont mises sur un milieu permettant la formation de myotubes : les résultats sont présentés ci-contre.

Dessin des myotubes à la fin de <u>l'expérience</u>

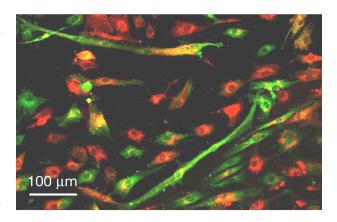
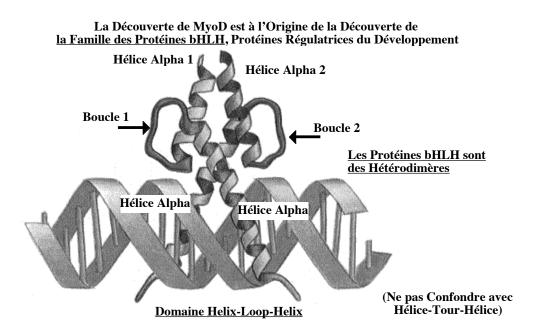


Figure 28 : MyoD est actif sous forme d'un hétérodimère (in www.med.univ-angers.fr)



Chapitre II.D.2 BCPST1, Lycée Hoche

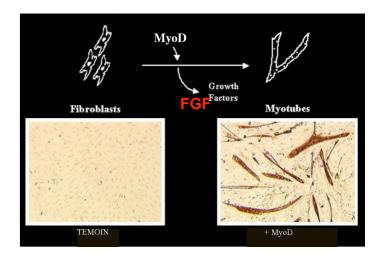
Figure 27 : MyoD et Myf5 sont des facteurs myogéniques

1. Effet de MyoD in vitro

<u>Protocole</u>:

Résultats:

<u>Conclusion</u>:



2. Etude in vivo : effet des pertes de fonction MyoD et Myf5 : souris transgéniques KO

MyoD -/-: souris normale

ARNm MRF4 et myogénine normaux

ARN Myf5

Myf5 -/-: souris normale

MyoD -/- et Myf5 -/- : mort à la naissance

pas de muscles

pas de myogénine, MRF4, ...

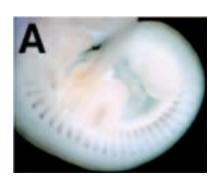
MyoD et Myf5 sont « interchangeables » Présence nécessaire d'au moins un des deux.

3. Etude in vivo: patrons d'expression de MyoD et Myf 5

Hybridation *in situ*: sonde anti sens MyoD

Souris transgéniques : gène de fusion = promoteur du gène X couplé à LacZ





Expression de MyoD



Figure 29 : cellules musculaires satellites (à titre de document)

Les cellules satellites situées sous la lame basale qui entoure la fibre musculaire striée squelettique sont des cellules souches unipotentes correspondant aux prémyoblastes embryonnaires.

Elles participent à la croissance du muscle chez le nouveau-né et le jeune. Elles représentent 30% des noyaux musculaires à la naissance.

Puis elles deviennent quiescentes chez l'adulte et ne participent normalement qu'à sa réparation en cas de lésion limitée. Elles ne représentent plus que 2% des noyaux musculaires chez l'adulte sédentaire, 4% chez un sportif et 8% chez un athlète.

Chez tout individu, les myocytes peuvent être endommagés par des exercices musculaires intenses qui déchirent les membranes plasmiques..

Lors d'un stress musculaire tel qu'un effort physique important conduisant à une hypertrophie musculaire, ou lors de lésions musculaires, la cellule satellite va passer du stade quiescent à un stade activé et exprimer Myf5 et MyoD afin de produire des myoblastes qui vont fusionner à la fibre musculaire. Certaines maladies telles que les myopathies (par exemple la **myopathie** de **Duchenne** due à une mutation dans un gène de structure de la fibre musculaire, qui code la dystrophine) miment une lésion musculaire chronique, et recrutent en permanence les cellules satellites jusqu'à un épuisement total.

Perspectives thérapeutiques : à partir de cellules souches, réparer des tissus cardiaques détruits par un infarctus.

Immunocytochimie : AC anti Pax 7 couplé à la GFP

