

**BIOLOGIE DU
DÉVELOPPEMENT
PCEM1 PARIS DESCARTES**

2007-2008

JEREMY DOCAO

I- Les étapes du développement

- 1) *Les principales étapes de l'embryogenèse*
- 2) *Les caractéristiques de la différenciation cellulaire*
- 3) *Les caractères généraux de l'œuf fécondé*
- 4) *Les différents types de segmentation*
- 5) *Les plans de coupes histologiques*

II- Embryologie descriptive : développement des amphibiens

- 1) *L'œuf d'amphibien*
 - 1.1 Description de l'œuf
 - 1.2 Rotation d'orientation
 - 1.3 Rotation de symétrisation (ou corticale)
- 2) *L'embryogenèse*
 - 2.1 Segmentation
 - 2.2 Transition blastuléenne
 - 2.3 Blastula
 - 2.4 Gastrulation
 - a. *Initiation de la gastrulation*
 - b. *Carte des territoires présomptifs*
 - c. *Mouvements de la gastrulation*
 - d. *Fin de gastrulation (fente blastoporale)*
 - 2.5 Neurulation
 - a. *Neurectoderme*
 - b. *Mésoderme*
 - c. *Endoderme*
 - d. *Stade bourgeon caudal*

III- Embryologie Expérimentale

- 1) *Expériences in vitro*
- 2) *Expérience de Nieuwkoop*
- 3) *Expérience de Spemann*
- 4) *Recherche des molécules inductrices*
 - 4.1 Technique in vitro
 - 4.2 Technique in vivo
 - 4.3 Stratégies de « perte de fonction »
 - a. *Injection d'ARN antisens*
 - b. *Expression de dominants négatifs*

IV- Induction et régionalisation du mésoderme

- 1) *Trois grands types de molécules sont impliqués*
 - 1.1 Facteurs de croissance
 - 1.2 Facteurs de Transcription
- 2) *Induction du mésoderme*
 - 2.1 Rôle de la β -caténine
 - 2.2 Rôle de Vg1
 - 2.3 Théorie des trois signaux...
 - 3.4 Gastrulation – réalisation du patron mésodermique

V- Mise en place du neurectoderme

- 1) *Induction du neurectoderme*
- 2) *Détermination et régionalisation du tube neural*
- 3) *Organogenèse*

Biologie du Développement

PCEM1 – Médecine Paris Descartes

I- Les étapes du développement

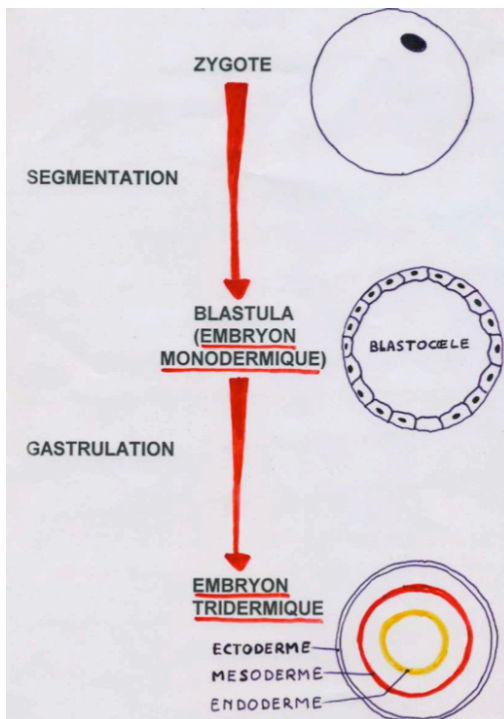
Le développement est caractérisé par deux phases principales : l'**embryogenèse** et la **période fonctionnelle**.

1) Les principales étapes de l'embryogenèse

L'**embryogenèse** (ou ontogenèse) commence avec la **formation du zygote** lors de la fécondation. Ce zygote est totipotent, il possède tous les moyens pour former un individu adulte. Le zygote entre ensuite dans une phase de segmentation, où il passe d'un état unicellulaire à un **état pluricellulaire**. Durant cette phase, il y a **peu ou pas d'expression du génôme**.

Le début de la morphogenèse est la phase de gastrulation, qui est une étape clé de l'embryogénèse. On a alors **expression du génôme dans certaines cellules**. Lors de cette gastrulation, on passe d'un embryon pluricellulaire à un **embryon tridermique** (composé de trois feuillets distincts). Chacun des feuillets est à l'origine de cellules spécifiques. Puis, lors de l'organogenèse, les différents organes se mettent progressivement en place ; on s'intéressera à la neurulation, première période de l'organogenèse.

La période fonctionnelle correspond à l'édification de l'organisme adulte : c'est un développement post-natal.



Le zygote entre en phase de segmentation, c'est-à-dire de **multiplication**. Cette segmentation est caractérisée par des **cycles cellulaires courts** : les cellules n'expriment pas leurs potentiels.

Après la segmentation, le zygote passe au stade de **blastula**, embryon monodermique pluricellulaire. On ne remarque toutefois **pas d'augmentation de volume** : lors de la segmentation, les blastomères deviennent de plus en plus petites. L'embryon se creuse aussi d'une cavité : le **blastocœle**, qui permet la gastrulation.

La gastrulation est caractérisée par l'**allongement des cycles cellulaires** (l'embryon exprime sa potentialité), mais aussi par des interactions cellulaires importantes : le blastocœle permet des mouvements cellulaires (**mouvements amibiens** et de **reptation**). Cela conduit à la spécialisation cellulaire et la **mise en place des trois feuillets** : à la périphérie, l'ectoderme (à l'origine de l'épiderme, du neuroectoderme); au centre, l'endoderme (jaune ou vert, à l'origine du tube digestif); et entre les deux, le mésoderme (muscles squelettiques, derme, ...) qui est le résultat de **phénomènes d'induction**.

L'induction concerne un **groupe de cellules dont le devenir est fixé de manière irréversible**. Le territoire endodermique secrète des molécules inductrices dans le milieu extérieur (facteurs de croissances), qui vont jouer sur des cellules réceptrices, dites **compétentes**. Ce sont les **cellules de l'ectoderme** : elles réagissent à un signal inducteur, et deviennent déterminées (formation du mésoderme).

Suite à la gastrulation, on obtient un **embryon tridermique** et l'organogénèse s'engage avec la neurulation : mise en place du tube neural.

Les mécanismes essentiels de construction de l'organisme pluricellulaire sont :

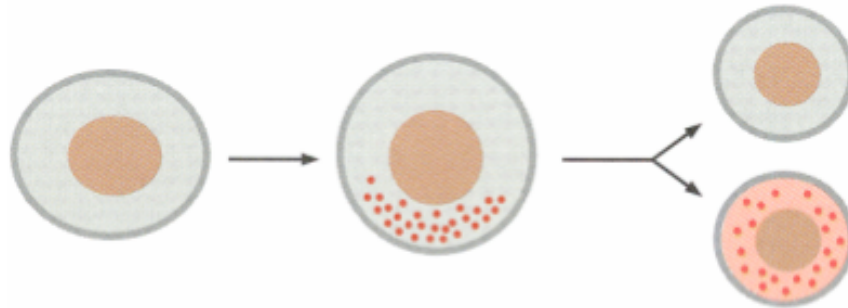
- la **prolifération cellulaire** (la multiplication par mitoses successives : cycles très courts, reflet de l'inexpression du génôme, essentiel pour la segmentation)
- puis lors de la gastrulation, les **mouvements cellulaires**. En se déplaçant les uns par rapport aux autres, les cellules interagissent entre elles par des phénomènes d'induction.

2) Les caractéristiques de la différenciation cellulaire

L'état différencié est un **état stable**, dans lequel la cellule est dans **un cycle long voire inexistant** (*G0*). Elle ne peut pas revenir à l'état indifférenciée.

Cette différenciation est le résultat de deux types de mécanismes fondamentaux : **l'existence de déterminants cytoplasmiques** (protéines, ARN, complexes ribonucléiques, localisés dans une région particulière du cytoplasme) et d'interactions cellulaires, impliquées dans des phénomènes d'induction.

Division asymétrique



Au cours de la division cellulaire, il peut y avoir une **répartition hétérogène** du contenu cytoplasmique : une cellule va hériter du déterminant cytoplasmique alors que l'autre non. Si ce déterminant est un facteur de transcription, alors une cellule pourra réguler l'expression d'un gène grâce à ce facteur de transcription, l'autre cellule ne le pourra pas. On parle **division asymétrique**.

La différenciation est caractérisée par l'**activation** et par la **répression de gènes spécifiques**, qui implique l'utilisation de facteurs de transcription. Pour cela, la chromatine doit être dans un **état de permmissivité** afin que ce facteur puisse se lier à l'ADN et qu'il y ait expression/répression du gène (*fibre décondensée*). Ainsi, la notion de remodelage de la chromatine est essentielle.

Ce remodelage s'effectue à l'aide de différentes enzymes :

- **HAT** (Histones Acétyl-Transférases),
- **HDAC** (Histones Déacétylases),
- **Méthylases et Enzymes de méthylation.**

On rappelle que l'acétylation des histones permet la **décondensation de la fibre chromatinienne** (*activation des gènes*), et que la méthylation au niveau du *promoteur* entraîne la **répression du gène**.

3) Les caractères généraux de l'œuf fécondé

Le zygote est polaire, totipotent, et possède de nombreuses réserves cytoplasmiques.

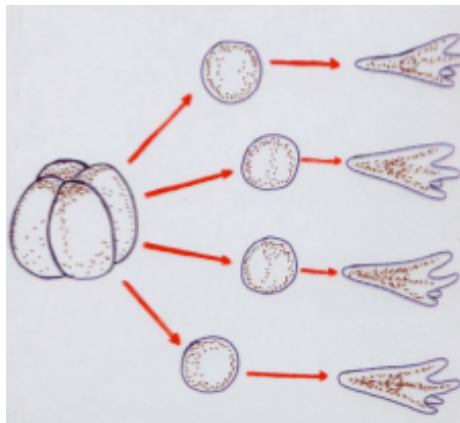
La cellule totipotente peut donner naissance à **tout type cellulaire d'un organisme**, voire à un organisme entier. En cela, **le zygote est la cellule totipotente par excellence**.

Il possède un indice mitotique élevé : les cycles cellulaires sont **courts**, donc il y a très peu ou pas d'expression des gènes de la cellule.

La cellule totipotente ne présente évidemment pas de caractères morphologiques spécialisés.

Le génôme est **largement inexprimé**, mais **peut répondre très rapidement à des mécanismes de contrôle** (*fibre décondensée*) : dans un environnement nouveau, les cellules peuvent se réadapter très rapidement.

Exemple chez l'oursin et chez la souris :



Au stade 4 cellules, on sépare les quatre blastomères et chacun des blastomères, isolés, peut former une larve pluteus : on rend compte d'une **régulation de déficiences**.

Au contraire, chez les souris (et les mammifères en général) : au stade 8 cellules, on peut prélever deux embryons chez deux femelles en gestation, et associer ces 16 blastomères dans un milieu adéquat. Si on laisse le développement aller jusqu'au stade blastocyste, et que l'on réimplante cet embryon dans une souris pseudo-gestante, il y a alors un **développement harmonieux de l'embryon** : le souriceau paraît normal, mais il est en réalité **chimère**. (Au niveau de tout les tissus, des cellules proviennent de l'un des deux embryons de départ). Il y a eu **régulation des excédents**.

D'autre part, les œufs (fécondés ou non), présentent une polarité : d'un côté on définit le **pôle animal** (lieu d'expulsion des globules polaires) et de l'autre, le **pôle végétatif**.

Toute une série de réserves est accumulée pendant l'ovogenèse. C'est, d'une manière générale, le **vitellus** (la grande partie des réserves vitellines étant d'**origine exogène**). Ces répartitions en réserves peuvent être hétérogènes.

La composition en vitellus est **essentielle pour la segmentation**, qui sera faite en fonction de sa répartition.

Ainsi on définit différents types d'œufs :

- les oligolécithes (oursins) sont très pauvres en réserves,
- les hétérolécithes (amphibiens) possèdent des réserves, mais réparties de manière inégale,
- les télolécithes (oiseaux et poissons), sont riches en réserves,
- les alécithes (mammifères placentaires), qui ne possèdent pas de réserves (échanges entre la mère et l'enfant via le placenta).

4) Les différents types de segmentation

Elle se fait en fonction des réserves vitellines :

- Segmentation totale ou holoblastique : elle se fait dans le cas des œufs oligolécithes, hétérolécithes, et alécithes.
- Segmentation partielle (méroblastique) dans le cas des **œufs télolécithes**. Chez les poules, cela correspond au jaune d'œuf (réserves protéiques). C'est une région superficielle, le disque germinatif.

Plus un blastomère est **riche en vitellus**, plus il va avoir **du mal à se diviser**, cela pour des raisons mécaniques.

On observe, de plus, deux types de segmentations totales :

- la segmentation radiaire, où les plans de segmentation sont **tour à tour méridiens et latitudinaux**,
- la segmentation spirale (chez le mollusque en particulier).

5) Les plans de coupes histologiques

La coupe **méridienne** passe par le pôle animal et le pôle végétatif,

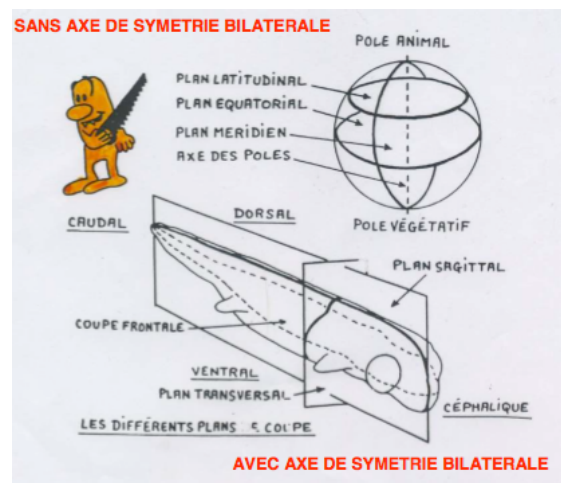
La latitudinale, perpendiculaire à l'axe des deux pôles, L'équatoriale est un cas particulier de la coupe latitudinale, passant à équidistance des deux pôles (équateur).

La coupe **sagittale** passe par le plan de symétrie bilatérale,

La coupe parasagittale est parallèle à la coupe sagittale,

La coupe **transversale** est perpendiculaire à la coupe sagittale,

La coupe frontale est perpendiculaire au plan sagittal, passant par l'axe céphalo-caudal.



II- Embryologie descriptive : développement des amphibiens

1) L'œuf d'amphibien

On a deux modèles d'études :

- les amphibiens urodèles (*pleurodeles waltlii*), qui gardent leur nageoire caudale toute leur vie,
- le xénope, qui connaît une réduction de sa nageoire caudale.

La fécondation chez les amphibiens

L'œuf est très volumineux (1,5mm), la fécondation et le développement se passent dans l'eau. C'est donc un modèle facile à étudier.

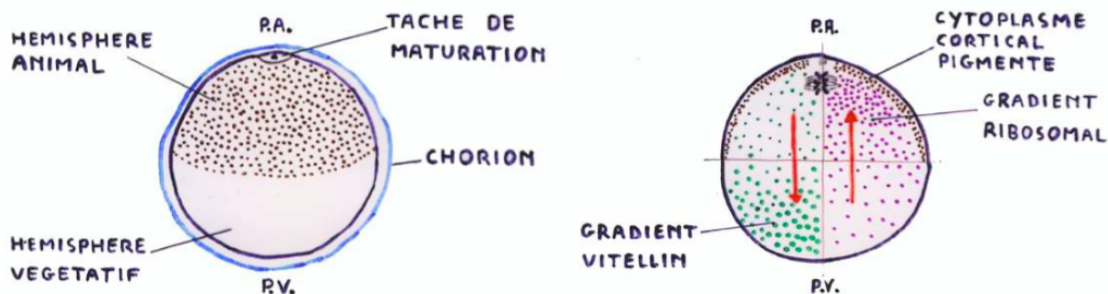
Chez le pleurodèle, le mâle arrive sous la femelle, l'accroche par les bras et entame sa danse nuptiale, qui dure quelques heures. La fécondation est externe : le mâle dépose ses spermatozoïde (spermatozoïde) sur le sol, et la femelle dépose des chapelets de 200 à 400 œufs non fécondés (ovocytes II bloqués en métaphase II) dessus. On observe déjà une polarité des ces œufs, l'hémisphère pigmenté correspondant au pôle animal.

Ces ovocytes II sont entourés de **plusieurs enveloppes protectrices** : notamment, une guangue gélatineuse commune, formés de mucopolysaccharides (polysaccharides qui se sont accumulés à l'ovocyte à mesure de son trajet dans les voies génitales femelles).

On met aussi en évidence une guangue de même composition, autour de chaque œuf, la coque.

Puis il y a une troisième couche protectrice, le chorion (représenté généralement en bleu), **étroitement accolée à la membrane plasmique de l'ovocyte**. Ce chorion est constitué de polysaccharides, ayant pour origine les cellules folliculaires, au niveau de l'ovaire (il correspond à la **zone pellucide**).

1.1 Description de l'œuf



Coupe méridienne

On peut observer sur l'œuf une **pigmentation hétérogène** ;

Une **première tâche de maturation** dépigmentée au pôle animal, correspondant au lieu d'expulsion du premier globule polaire (ainsi que celui du deuxième GP) ;

On met en évidence des enveloppes protectrices : le chorion, la coque et la guangue ; et surtout deux gradients opposés :

- le gradient vitellin (plaquettes vitelinales composées à plus de 80% de deux protéines : la lipovitelline et la phosvitine), **croissant du pôle animal vers le pôle végétatif**,
- le gradient ribosomal [ribonucléoprotéique] (révélablé au bleu de toluidine), **croissant du pôle végétatif vers le pôle animal**.

C'est le cytoplasme cortical qui est pigmenté, juste sous la membrane plasmique, au niveau de l'hémisphère animal.

On met aussi en évidence la **plaque métaphasique** (bloquage en métaphase II), disposée tangentiellement à la membrane plasmique, juste sous la région de la tâche de maturation. Il n'y a pas de vésicule germinative (correspondant au noyau).

Au moment de la fécondation, l'impact du spermatozoïde s'effectue toujours **dans l'hémisphère animal** de l'ovocyte II. Cela provoque une série de réactions : les **réactions d'activation**.

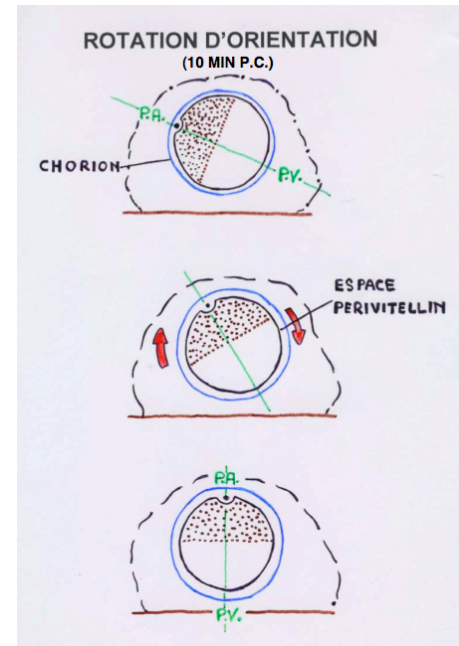
1.2 Rotation d'orientation

D'une manière générale, la rotation d'orientation se produit dès les 10 minutes qui suivent la rencontre avec le spermatozoïde.

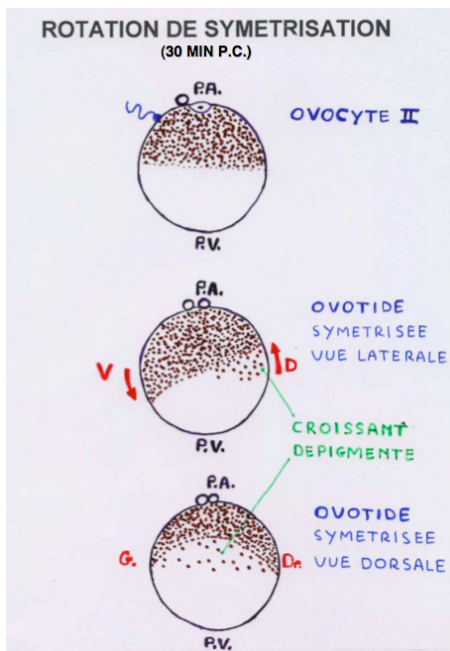
Les ovocytes II n'ont pas d'orientation particulière. Au moment de la rencontre des deux gamètes, au niveau du pôle animal, il y a une réaction d'activation : exocytose de granules corticaux, ce qui entraîne une sortie d'eau, et la **membrane plasmique se décolle alors du chorion**. Un espace périvitellin s'est formé entre la membrane plasmique et la zone pellucide.

L'ovocyte s'oriente alors suivant la gravité : **l'hémisphère végétatif**, riche en vitelline, est plus lourde et donc orientée vers le bas.

C'est le **premier critère de fécondation**.



1.3 Rotation de symétrisation (ou corticale)



Elle s'effectue 30 minutes après l'impact du spermatozoïde. Ce n'est pas une rotation de l'œuf, mais une *rotation des pigments corticaux*.

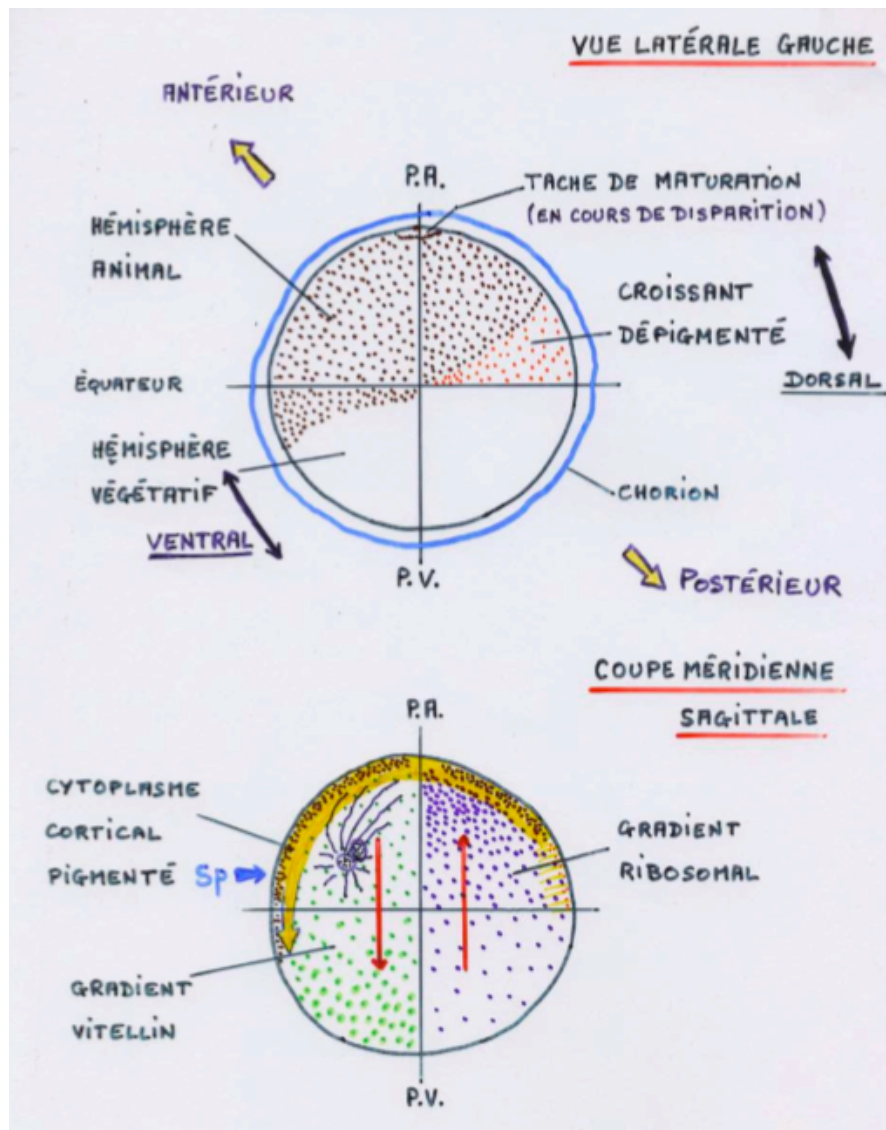
Dans 60% des cas, la bascule pigmentaire se fait **vers le point d'impact du spermatozoïde**.

En même temps, il y a reprise de la deuxième division de méiose et expulsion du deuxième globule polaire. Cette expulsion se fait au niveau de la tâche de maturation, qui **disparaît** avec la symétrisation : il y a **apparition d'un croissant dépigmenté** (le croissant gris chez le xénope). Ce croissant dépigmenté correspond à la région dorsale de l'embryon.

On a donc **mise en place de l'axe de symétrie bilatéral (antéro-postérieur)**, dès la 30^{ème} minute : cela est très précoce chez l'amphibien.

Dans 40% des cas, la rotation de symétrisation se fait de manière aléatoire.

Cette rotation de symétrisation constitue un **deuxième critère de fécondation**.



2) L'embryogenèse

2.1 Segmentation

Chez les amphibiens, elle dure 24h à 18°C (température de référence).

La segmentation est totale, holoblastique : l'intégralité de l'œuf se segmente ; elle est inégale, et cela **dès le troisième cycle**. Ceci est le reflet du **caractère hétérolécithe** de l'œuf : l'hémisphère végétatif, plus riche en vitellin, subit une segmentation plus lente.

Le premier plan de clivage passe toujours par le pôle végétatif et le pôle animal, il est méridien. Dans 50% des cas, le plan de clivage passe par le plan de symétrie bilatérale (formant deux héli-embryons). Sinon, cela se fait au hasard.

Le deuxième, perpendiculaire au premier, est aussi méridien (segmentation radiaire).

Le troisième plan de segmentation est latitudinal, sus-équatorial (légèrement au dessus de l'équateur). Cela est dû à la présence de réserves vitellines extrêmement importantes au niveau végétatif : à partir de maintenant, la segmentation est inégale.

Les blastomères vont être classés en deux types :

- les micromères, cellules de l'hémisphère animal, pauvres en vitelline : ils vont se segmenter plus rapidement (cycles cellulaires courts) ;
- les macromères, cellules de l'hémisphère végétatif, riches en vitellus : ils vont se diviser plus difficilement pour des raisons mécaniques (cycles cellulaires longs).

! A ce stade de la segmentation, il y a toujours aucune expression des gènes.

Au terme de ces 24h, il y a eu **12 à 14 cycles cellulaires**, ce qui donne un embryon pluricellulaire caractérisé par 6 000 à 10 000 blastomères. Le volume de l'embryon n'a pas augmenté : au terme des différentes divisions de mitose, les blastomères sont donc **de plus en plus petits**.

La **segmentation** est donc **totale, inégale et radiaire**.

nb : au stade 128 cellules, l'aspect morphologique de l'embryon correspond au stade morula.

2.2 Transition blastuléenne

Au début de la segmentation, les cellules sont en phase synchrone, avec des cycles courts d'environ 80min pour les 9 premières divisions, chez l'amphibien pleurodèle. Il n'y a alors pas d'expression du génôme, les phases **G1 et G2 sont inexistantes**.

A partir du 10^{ème} cycle, l'embryon entre dans une phase asynchrone : dans certaines cellules, le cycle commence à s'allonger, les phases **G1 et G2 apparaissent**. C'est le reflet du début de l'expression du génôme embryonnaire : c'est la **transition blastuléenne**.

Avant la transition blastuléenne, il n'y a pas d'expression du génôme. Les fibres chromatinienues sont pourtant peu condensée : il n'y a pas d'hétérochromatinisation, mais une **répression des gènes** (à l'origine de la totipotence).

Le **recrutement d'histones déacétylases** (HDAC) au niveau du promoteur des gènes participe à l'inactivation de la chromatine de l'embryon à partir de la transition blastuléenne.

Deux grands mécanismes permettent aux gènes embryonnaires d'être ainsi réprimés :

- la **méthylation** intervient dès l'œuf fécondé. Il y a une activité très importante d'ADN Méthyltransférase : reconnaissance des boîtes C-G au niveau des **promoteurs** (XNmtl) méthylés, reconnus par des facteurs de transcription : en l'occurrence, ces facteurs de transcription sont des répresseurs.

*Cas de la protéine **KAIISO** : facteur de transcription répresseur à domaine MBD (methyl-CpG-binding domain), qui vient reconnaître des séquences d'ADN méthylés. Kaiso se fixe à une région cis méthylée, et recrute par des interactions protéines-protéines des HDACs. Cela entraîne la désacétylation des histones et la répression de la transcription de nombreux gènes avant la transition blastuléenne (empêchant le déplacement des ARN Polymérases).*

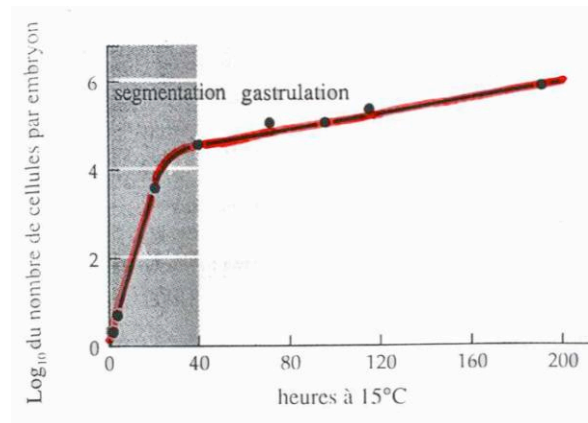
Puis, la déméthylation de l'ADN lèverait la répression. (?)

- dans le cas de l'ADN non méthylé, il existe des **co-répresseurs de la transcription**.

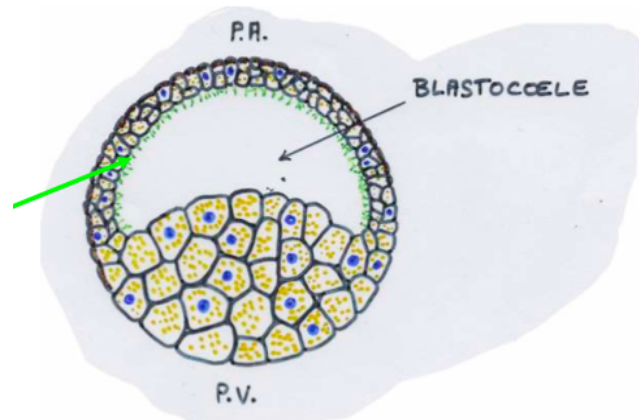
*Cas de la protéine **Groucho** : le gène codant pour la protéine Siamois est réprimé par un mécanisme méthylation-indépendant : un facteur de transcription, **Tcf-3**, vient se fixer sur le promoteur du gène. Tcf-3 est une protéine possédant le domaine HMG (80 aa), nécessaire à son association avec l'ADN.*

Tcf-3 n'est cependant pas suffisant pour entraîner la trans-activation du gène : il va être associé à des cofacteurs (corépresseurs ou coactivateurs). Avant la transition blastuléenne, Tcf-3 est associé à la protéine **Groucho**, qui recrute des HDACs : dsacétylation du gène et répression de la transcription (il n'y a pas cependant pas condensation en fibre de type B). Au moment de la transition blastuléenne, il va y avoir une **compétition avec la β -caténine**, coactivateur de la transcription. β -caténine va remplacer Groucho et lever l'inhibition du gène (transcription de Siamois) : il est probable que β -caténine recrute des HATs.

La fréquence de division cellulaire chute considérablement après la phase de segmentation. Lors de la gastrulation, la prolifération se fait de manière asynchrone.



2.3 Blastula



Au terme de la segmentation, on obtient une **blastula** : c'est un œuf en cours de division, dans lequel il se creuse le blastocœle (dès le stade 8 blastomères).

Ce blastocœle, chez les amphibiens, est excentré au niveau de l'hémisphère animal, composé de deux à trois assises de micromères dynamiques, alors que l'hémisphère végétatif est composé de macromères inertes, riches en plaquettes vitellines.

Le toit du blastocœle est **tapissé par des protéines de la matrice extracellulaire** comme le collagène, la fibronectine et la laminine, qui sont essentiels aux mouvements de reptation. Ces protéines ne sont synthétisées que par les cellules du toit du blastocœle.

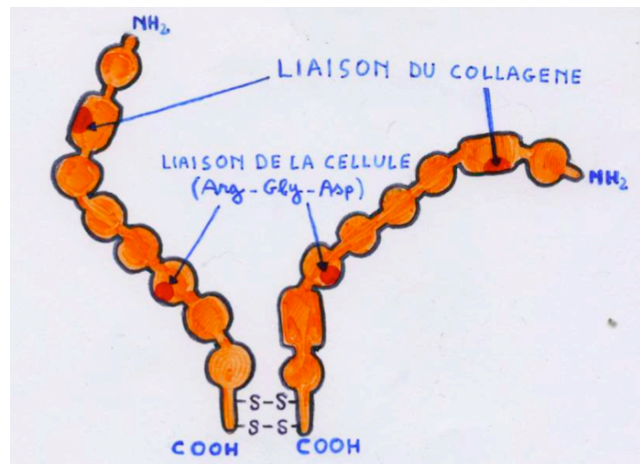
Le plancher du blastocœle, composé de macromères végétatifs, ne contient **aucune protéine** de la matrice extracellulaire.

Les activités de synthèse commencent **après la transition blastuléenne** : les ARNm codants les tubulines, les histones sont stables et d'origine maternelle.

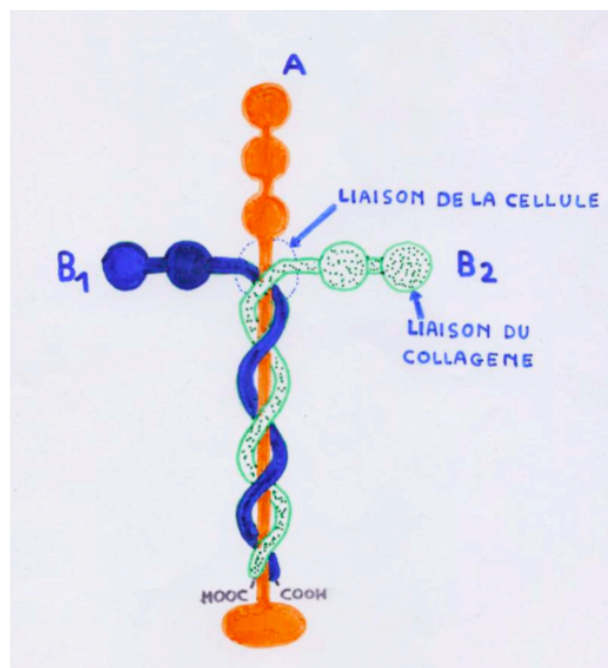
De plus, du fait de la multiplication très active des cellules, on a une synthèse d'ADN très active, et des phases S répétées.

Fibronectine : homodimère glycoprotéique de 460kDa, possédant deux chaînes polypeptidiques associées par deux ponts disulfures, dans la région C-Terminale.

On met en évidence différents domaines de liaison : du collagène, de la cellule. Ce dernier domaine est un tripeptide nécessaire et suffisant à la liaison de la cellule, caractérisée par sa séquence Arg-Gly-Asp. Une fibronectine peut donc être associée à deux cellules différentes.



Laminine : hétérotrimère (A-B₁-B₂) glycoprotéique de 400kDa. Il existe un domaine de liaison du collagène, et un domaine de liaison de la cellule.



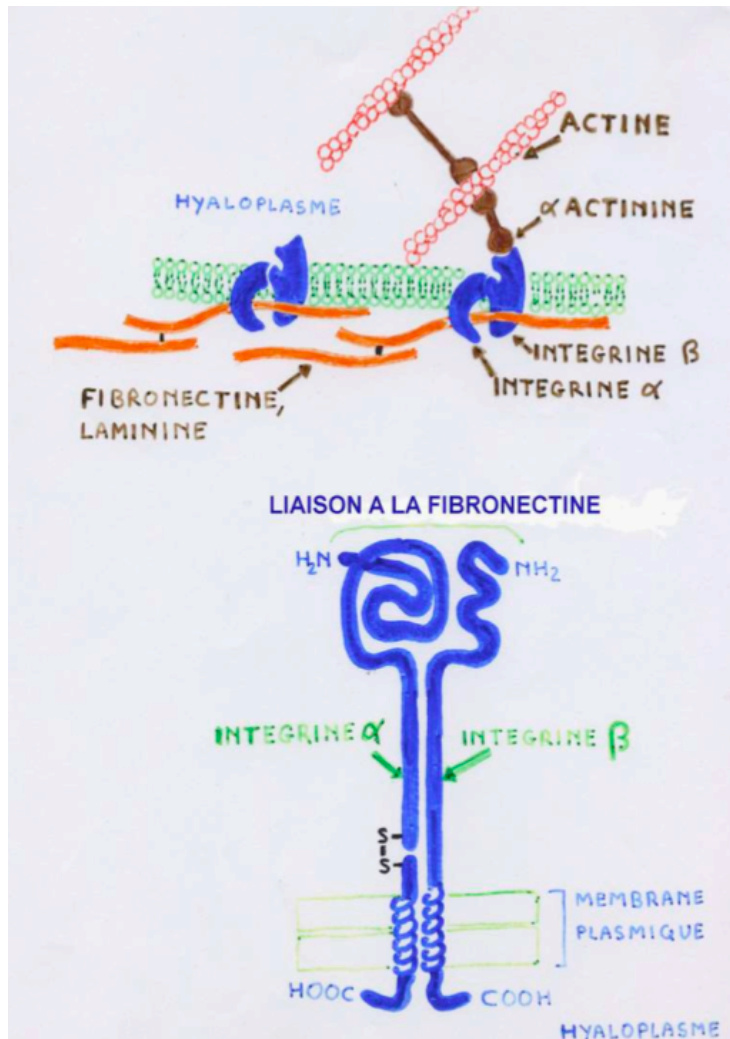
Les récepteurs cellulaires à la fibronectine, à la laminine et au collagène sont les **intégrines**, qui sont des hétérodimères α/β . (α est lui-même constitué de deux chaînes polypeptidiques, reliées par des ponts disulfures).

La région C-Terminale, hyaloplasmique, est relativement **courte**. Une région est ensuite hydrophobe, présente dans les deux sous-unités, traversant la membrane en **hélice α** . La région N-Terminale est extracellulaire, elle **permet la fixation aux protéines de la MEC**.

Il existe un **polymorphisme** au niveau des intégrines α et β : cela permet de former des sites de fixation aux différentes protéines de la MEC.

Les intégrines sont présentes sur toutes les cellules de l'embryon.

Ce sont donc le lien entre les microfilaments d'actine du hyaloplasme et la MEC.



Exemple de la liaison à la fibronectine par les intégrines

2.4 Gastrulation

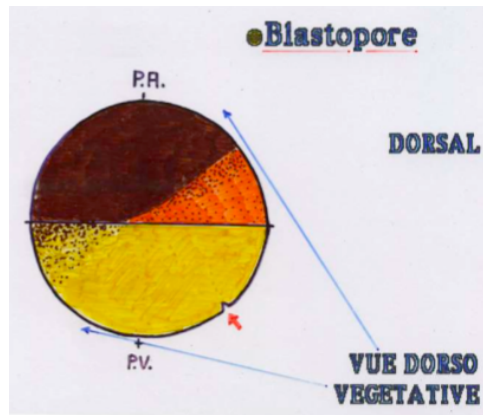
C'est le début de la morphogenèse. Comme la segmentation chez l'amphibien, la gastrulation dure **24h** à 18°C. Pendant cette phase de gastrulation, on a la **mise en place d'un embryon tridermique** (présentant les trois feuillets : ectoderme, mésoderme et endoderme).

La durée des cycles cellulaires des blastomères s'allonge : c'est le reflet de l'**expression des gènes** embryonnaires. Le volume de l'embryon évolue peu.

Les différents mouvements morphogénétiques :

- l'invagination : chez l'oursin, c'est le seul mouvement morphogénétique lors de la gastrulation : tout l'hémisphère végétatif rentre à l'intérieur de l'embryon ;
- l'épibolie : c'est un mouvement de *recouvrement* conduit par la **multiplication des cellules** de l'hémisphère animal sur le pôle végétatif, qui est en cours d'invagination ;
- l'élongation ;
- la convergence : une série de cellules converge **vers le blastopore** (lieu d'invagination) ;
- la divergence : une série de cellules à l'intérieur de l'embryon diverge.

En fin de segmentation, on peut observer l'embryon suivant un axe dorso-végétatif :

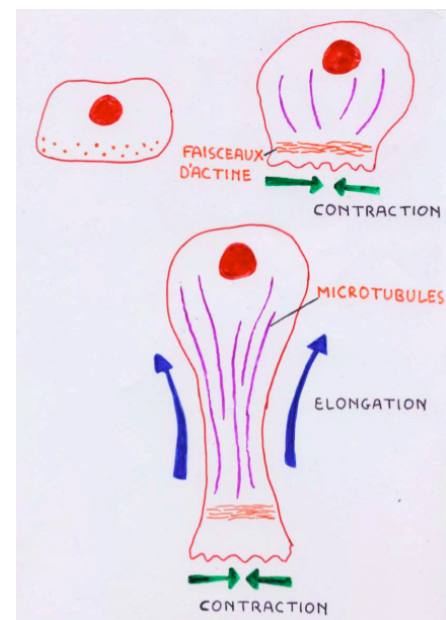


a. Initiation de la gastrulation

Au niveau de quelques macromères végétatifs, **certaines cellules s'invaginent** (elles vont rentrer dans l'embryon) : ce sont les cellules en bouteille. Cette invagination se fait dans la région dorso-végétative à l'endroit où le croissant dépigmenté est le plus large.

Une petite dépression se met en place : l'encoche blastoporale.

Ce mouvement commence par un phénomène de contraction : mise en place de faisceaux d'actine qui se contractent avec les microfilaments de myosine, avec en parallèle une polymérisation des microtubules (apparition d'une **polarité** : région apicale et basale). La cellule s'allonge, s'enfonce dans l'embryon.



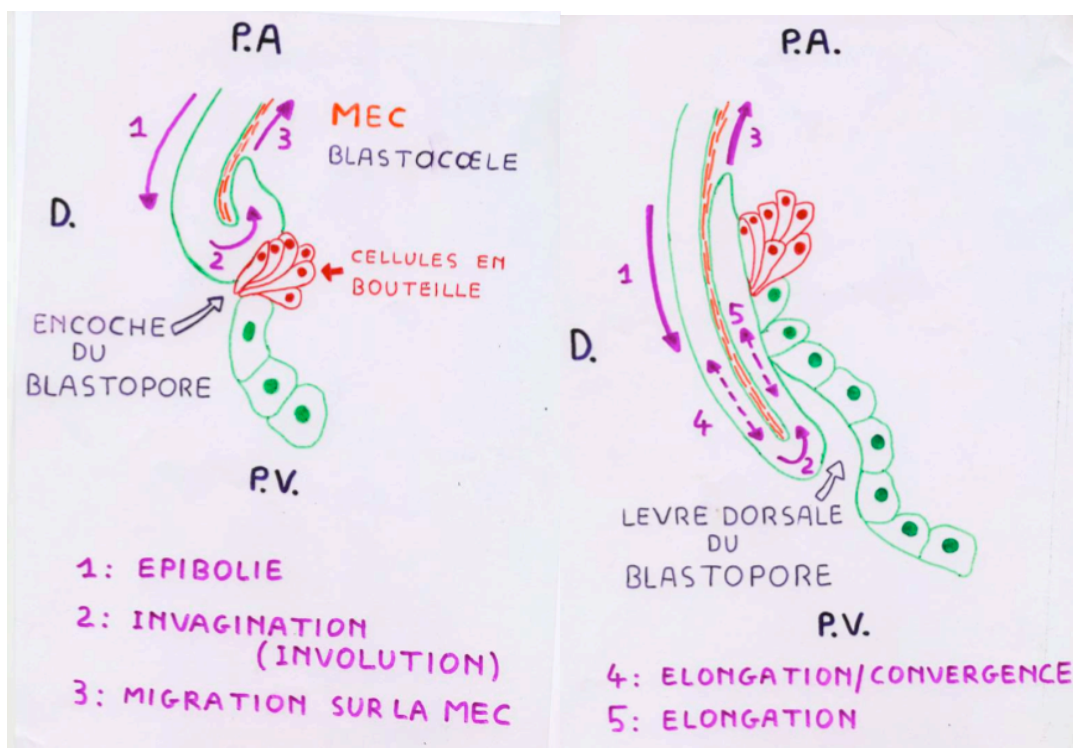
La mise en place de ces cellules en bouteille est conditionnée par des **facteurs** que l'on met en évidence dans la région dorso-végétative.

L'invagination des cellules en bouteille entraîne l'invagination des macromères, et des micromères au-dessus par un phénomène de recouvrement (**épibolie**), où ils vont s'associer au toit du blastocœle : c'est le moteur de la gastrulation, les micromères se déplacent par des mouvements de reptation. Au terme de la gastrulation, les micromères de la région animale recouvrent complètement l'embryon (partie pigmentée), et les macromères végétatifs se retrouvent à l'intérieur de l'embryon.

Au stade lèvres dorsales du blastopore, les micromères convergent en direction de la fente. Le phénomène est engagé : ils s'invaginent par un mouvement de **tapis roulant** (migration sur la matrice extracellulaire du toit du blastocœle). Il y a **élongation** de ces cellules.

Ainsi, les macromères végétatifs sont **tractés** par les mouvements des micromères, tandis que les micromères de la région animale convergent en direction du lieu d'invagination.

Les cellules en bouteille ne servent plus à rien (rôle initiateur).

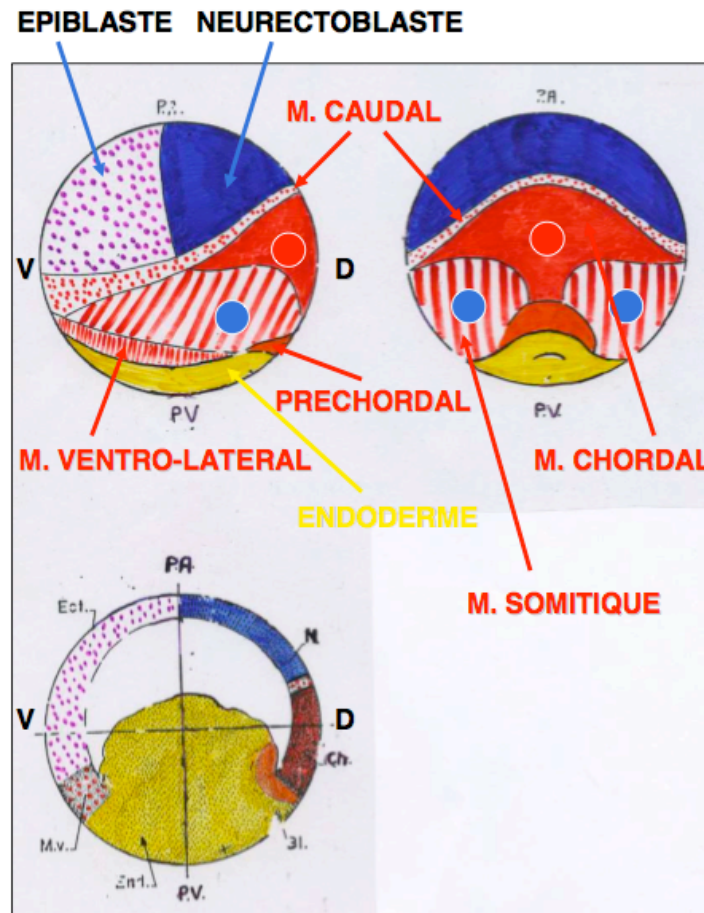


b. Carte des territoires présomptifs

L'étude des mouvements de la gastrulation se faisait à l'origine par l'utilisation des marques colorées : on prend un embryon en fin de segmentation, que l'on met dans de l'eau avec de la pâte à modeler. Entre la pâte et l'embryon, on peut mettre de l'agar dans lequel on met un colorant : **bleu de nils** ou **rouge ponceau**. Il y a **diffusion du colorant** à l'endroit où l'on a posé l'agar et ainsi un groupe de blastomères est marqué, et l'on pourra suivre le devenir de ces cellules durant la gastrulation. Cela a permis d'établir la carte des territoires présomptifs de l'embryon.

Il existe maintenant d'autres techniques comme la technique de lignage cellulaire, qui permet de suivre le devenir **d'une cellule**. Elle se fait par injection d'une grosse molécule (dextran) couplée à un fluorochrome : cette molécule ne va pas diffuser, on aura donc **marquage de toutes les cellules filles** du blastomère initial.

La carte des territoires présomptifs de l'embryon a été établie grâce aux techniques précédentes. Chez le pleurodèle : vue latérale, dorsale et méridienne, sagittale :



Nomenclature : tant que le territoire est présomptif (pas encore déterminé), on parle de blaste. A partir du moment où le territoire a une destinée, irréversible, on parle de derme.

L'ectoblaste : neuroblaste (*neurectoderme*) et épiblaste (*épiderme*).

L'endoderme correspond globalement aux macromères végétatifs. La région est déterminée très précocément durant la segmentation (c'est le premier feuillet à l'être).

Entre les deux, on a une zone marginale, le mésoblaste :

- dans la région dorsale, on a le mésoblaste chordal (*chorde*) qui correspond à la zone du **croissant dépigmenté**.
- Sous cette région, le mésoblaste préchordal (*mésoderme de la région céphalique de l'embryon*). C'est le premier territoire mésodermique à s'invaginer durant la gastrulation : c'est là que se forme l'encoche blastoporale.
- De part et d'autre de la chorde, le mésoblaste somitique (*somites*) : ce sont de petits blocs segmentés paraxiaux. Ils donneront le derme, la musculature, le squelette, ...
- Le mésoblaste ventro-latéral (*lames latérales*).
- Le mésoblaste caudal s'invagine en dernier, il se situe au niveau de la limite d'invagination.

Au dessus de la limite d'invagination, durant la gastrulation, les cellules ne s'invagineront jamais. Il y aura convergence et épibolie.

c. Mouvements de la gastrulation

1- Stade encoche blastoporale

Il y a invagination de **cellules en bouteille**. On observe un phénomène d'élongation des cellules du **m. chordal** qui convergent **vers l'encoche blastoporale**.

2- Lèvre dorsale du blastopore

A ce stade, il y a mouvement d'élongation du **m. somitique**, en direction du lieu d'invagination. Le **m. chordal** y converge aussi.

Il commence à y avoir invagination du **m. chordal**. On peut observer de plus en plus de pigments : c'est le reflet du phénomène d'épibolie des micromères de la région animale (ectoblaste).

3- Anse de panier

Le phénomène d'invagination continue : la lèvre dorsale se poursuit par deux lèvres latérales.

Le **m. chordal** est complètement invaginé, et le **m. somitique** s'invagine au niveau des lèvres latérales. Le mouvement d'épibolie de l'ectoblaste se poursuit.

i- Fer à cheval

Stade intermédiaire : correspond au stade où la lèvre ventrale du blastopore se met progressivement en place.

4- Lèvre ventrale du blastopore

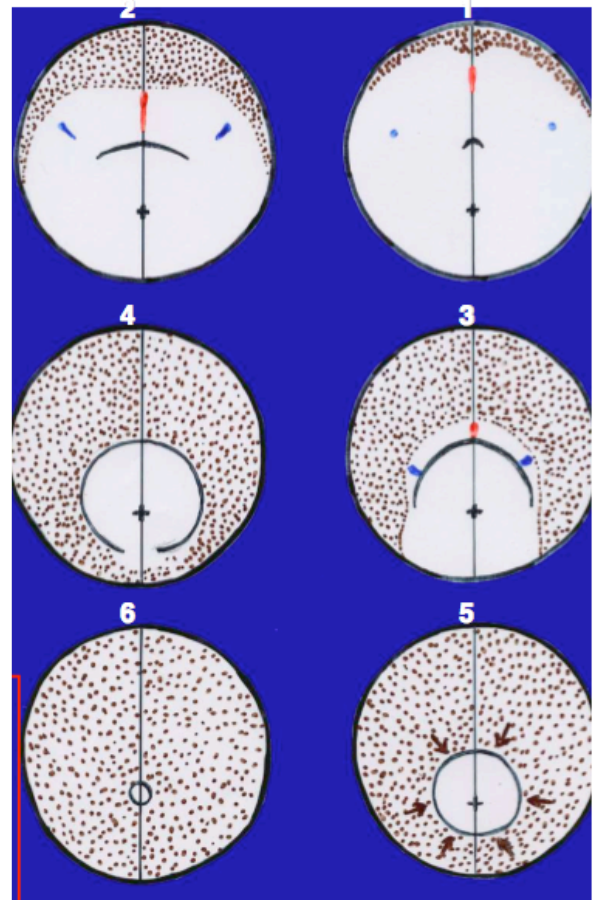
Au niveau de cette lèvre ventrale, il y a invagination du **m. ventral** au niveau de la lèvre ventrale ainsi que du **m. latéral** au niveau des lèvres latérales. L'épibolie se poursuit.

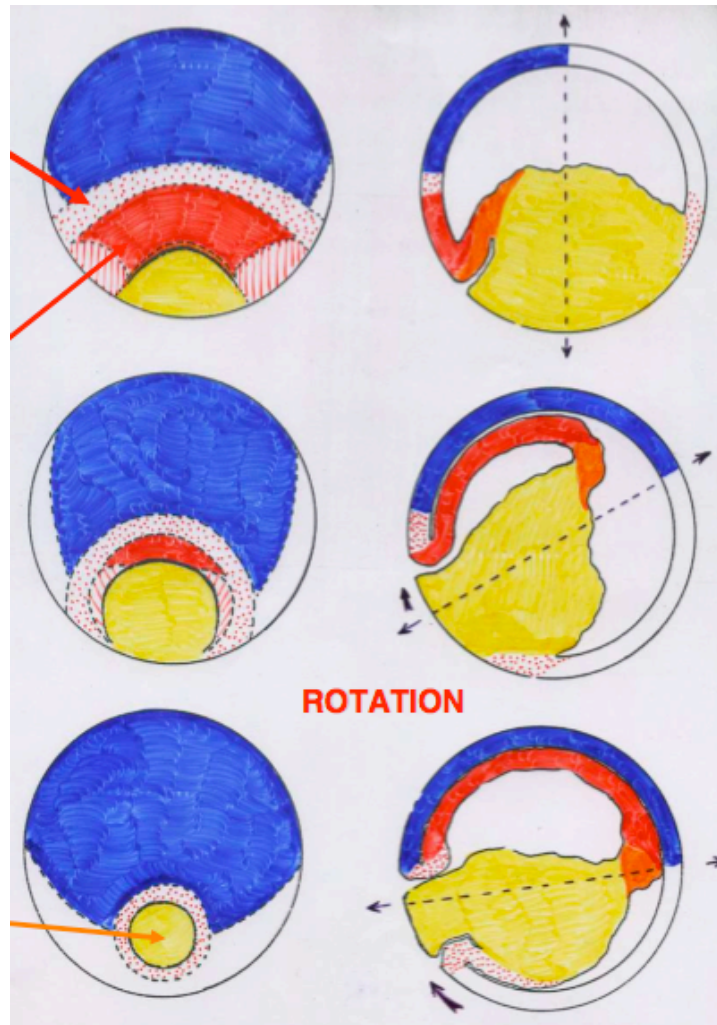
5- Bouchon vitellin

L'essentiel du mésoblaste est alors invaginé. Une petite bande (correspondant au **m. caudal**) n'est toutefois pas encore invaginé : le bouchon vitellin est constitué de ces derniers macromères végétatifs : c'est de l'endoderme, à la fois tracté et poussé par des cellules plus dynamiques. L'épibolie se poursuit.

6- Fente blastoporale

Ce stade correspond à l'invagination complète des macromères végétatifs : le bouchon se réduit puis **disparaît**. A terme, on a formation d'une petite fente : la fente blastoporale. Tout le **mésoderme** s'est invaginé, l'embryon est complètement recouvert par l'ectoderme.





Vue dorsale | Coupe méridienne, sagittale

On voit le stade lèvre dorsale (2), anse de panier (fer à cheval, i), et bouchon vitellin (5).

1- Au stade lèvre dorsale, il y a déjà invagination du m. préchordal. Finalement, cette zone correspond à du mésoblaste chordal (croissant dépigmenté).

Tout ce qui est en dessous de la limite d'invagination, représenté par le m. caudal, va se retrouver à l'intérieur de l'embryon (invagination), et il va y avoir épibolie des cellules au dessus.

Le blastocœle est toujours très développé, il n'y a pas encore eu rotation de l'embryon.

2- Au stade anse de panier, le m. chordal est presque complètement invaginé. Le mésoblaste chordal s'est allongé : c'est le reflet de phénomène d'élongation. Une nouvelle cavité se forme : le tube digestif primitif, l'**archentéron**, qui va tendre à faire **disparaître le blastocœle**. L'arrivée de grosses cellules à l'intérieur de l'embryon entraîne un phénomène de bascule.

! Au terme de la gastrulation, après la bascule, on ne peut ainsi plus parler de pôle animal / pôle végétatif.

3- Au stade bouchon vitellin, l'embryon est recouvert du neurectoblaste et de l'épiblaste. Le m. caudal est le dernier territoire à s'invaginer. Le blastocœle a **disparu** : l'archentéron est au **maximum de son développement**. L'endoderme s'est complètement invaginé.

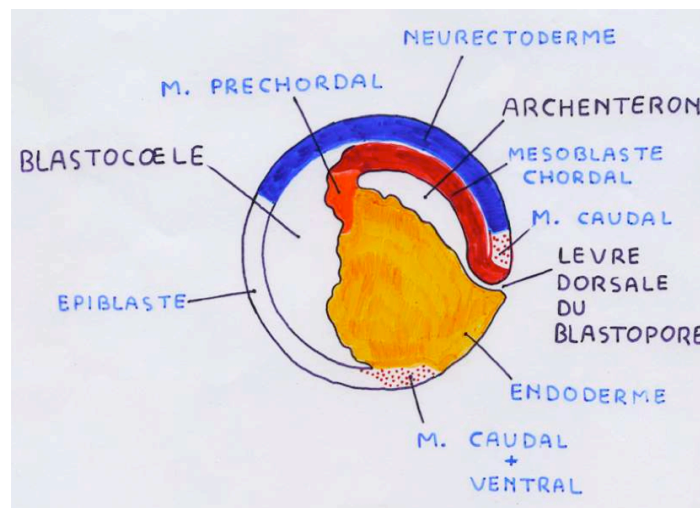
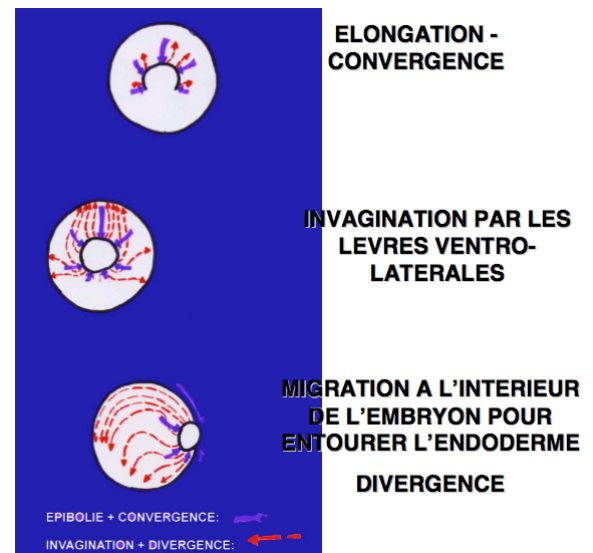
A noter, il y a un contact très étroit entre le m. caudal et le neurectoderme (phénomènes d'induction).

Mouvement de divergence : ce mouvement concerne essentiellement le mésoderme ventro-latéral.

Le m. chordal va subir directement un mouvement d'élongation et de convergence en direction du blastopore. Il subira l'invagination : mouvement en tapis roulant. En se fixant sur le toit du blastocœle, il se déplace par des mouvements de reptation vers la région céphalique.

Le m. somitique converge et s'invagine au niveau dorso-latéral, et s'étale de part et d'autre de la corde : les somites sont de petites structures paraxiales.

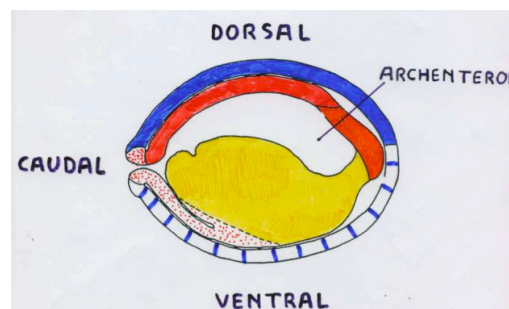
Le m. ventro-latéral s'invagine au niveau des lèvres ventrales et latérales, et tout de suite, va avoir tendance à s'étaler : il **diverge** à l'intérieur de l'embryon.



Coupe sagittale de gastrula, au stade anse de panier.

d. Fin de gastrulation (fente blastoporale)

Durant la gastrulation, l'embryon **augmente peu de volume**, mais à la fin, on observe qu'il **s'allonge très légèrement**. Tout le matériel endodermique s'est invaginé, à part le mésoblaste caudal. L'archentéron est alors très développé. L'embryon est devenu tridermique : les trois feuillets sont déterminés. On a une symétrie bilatérale : axes antéro-postérieur (ou céphalo-caudal) et dorso-ventral.



2.5 Neurulation

La neurulation est la **première étape de l'organogenèse**, durant laquelle le tube nerveux se met en place, avec du côté céphalique le cerveau, et du côté caudal la moelle épinière. A ce stade, il y a aussi une **régionalisation du mésoderme** et au niveau de l'endoderme, il y a **fermeture du toit de l'archentéron**.

a. Neurectoderme

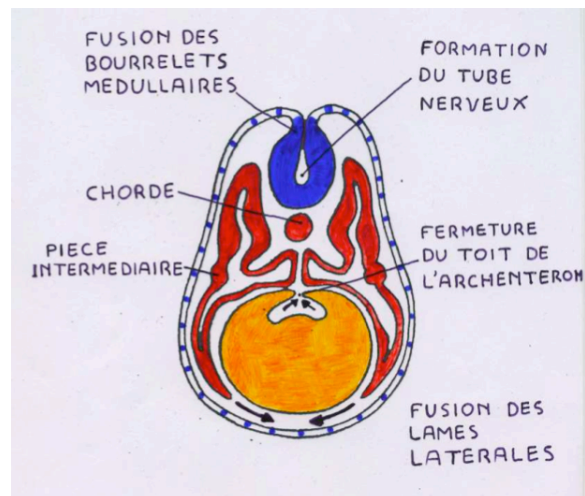
L'étape initiale de la neurulation est l'**épaississement du neurectoderme**, qui forme d'abord une plaque neurale du côté dorsal.

Cette plaque se soulève sur les côtés latéraux et forme ainsi des **bourrelets neuraux** qui donnent à l'embryon une forme en **raquette** (large à la région céphalique).

Les bourrelets neuraux se soulèvent progressivement et **s'accolent d'abord du côté médian, puis caudal, puis céphalique**, ils forment ainsi une gouttière neurale.

Les bourrelets vont ensuite **fusionner** progressivement et former un tube nerveux. Au niveau caudal, il existe un espace où **les bourrelets n'ont pas complètement fusionné** : c'est le neuropore postérieur.

A ce stade, le neurectoderme est toujours en contact avec l'épiderme.



b. Mésoderme

Le deuxième grand événement de la neurulation est la régionalisation du mésoderme, qui va **s'individualiser** en différentes structures :

- La **chorde**, qui est un organe axial, transitoire, dégénérant en fin de développement.
- Du côté dorsal, on assiste à un **épaississement du mésoderme somitique** qui se creuse d'une cavité, et qui va se régionaliser : la région la plus dorsale est la partie la plus épaisse, elle donne les **somites cavitaires** qui se prolongent par le mésoblaste latéral.
- En dessous, la pièce intermédiaire (donnant le *rein primitif*) commence à se différencier. Elle se termine par les lames latérales qui vont **fusionner du côté ventral**.

c. Endoderme

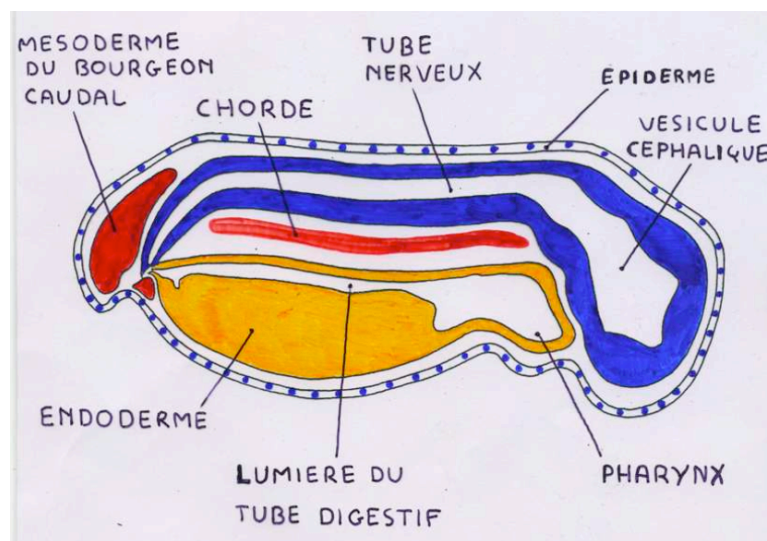
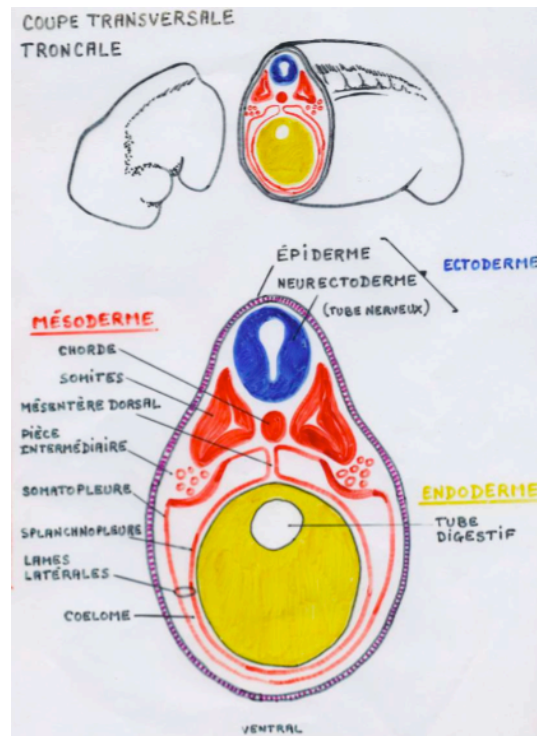
On assiste à la **fermeture progressive du toit de l'archentéron** par le **soulèvement latéral** de l'endoderme.

d. Stade bourgeon caudal

C'est le dernier stade de la neurulation. Un massif mésodermique dans la région postérieure de l'embryon donnera la queue : le **bourgeon caudal**.

- Au niveau de l'ectoderme : il y a **séparation et individualisation de l'épiderme** qui recouvre l'embryon, **et du neurectoderme** qui forme le tube nerveux. Du **côté céphalique**, on distingue le champ morphogénétique de l'œil.

- Au niveau du mésoderme : il y a eu **individualisation des somites du côté dorsal** (*muscles squelettiques, os, ..*) et des **pièces intermédiaires**. Les **lames latérales** sous la corde **viennent s'accoler au niveau du mésentère dorsal**. Elles se creusent d'une cavité, le coelome. La partie la plus interne des lames forme la splanchnopleure et la partie la plus externe la somatopleure.
- Au niveau de l'endoderme, le toit de l'archentéron est fermé, il constitue la *future lumière du tube digestif*.



Coupe sagittale d'un embryon au stade bourgeon caudal

III- Embryologie Expérimentale

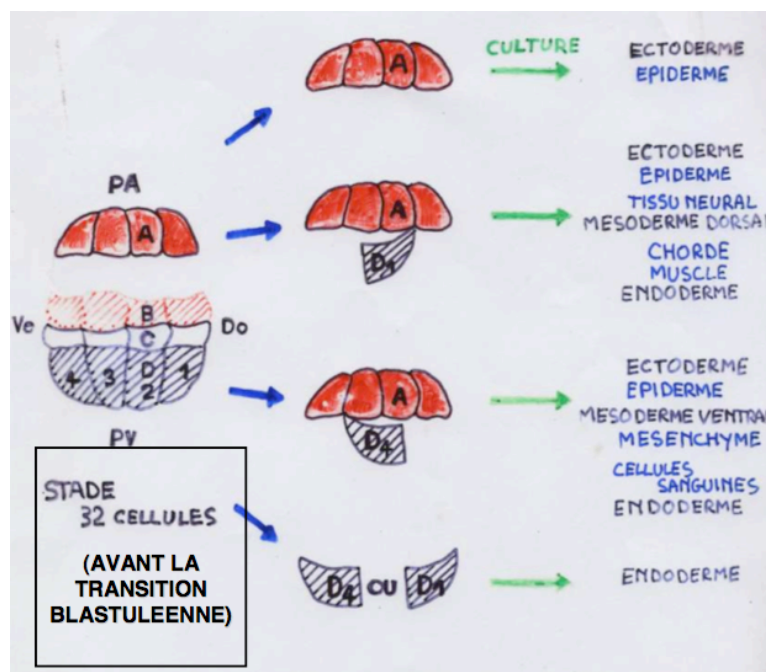
1) Expériences *in vitro*

Cette expérience a lieu au stade 32 cellules, donc avant la transition blastuléenne : il n'y a aucune expression du génôme zygotique.

L'embryon présente **trois régions** : la région animale (micromères pigmentés A), végétative (macromères **D1 à D4**, de dorsal à ventral) et la zone marginale (cellules B et C).

- Si à ce stade on met la calotte animale en culture, on obtient de l'épiderme.
- Si on met des macromères végétatifs en culture, on n'obtient que de l'endoderme.
- Si on met en culture un blastomère végétatif avec la calotte animale, il y a **induction de mésoderme**. Les macromères sont déjà déterminés (endoderme) et les micromères de la région animale sont des cellules récepteurs, compétentes.
 - Si on associe D1 à la calotte animale, on obtient de l'épiderme, du **neurectoderme**, le mésoderme **dorsal** (présence de *structures chordales et musculaires*), et bien sûr de l'endoderme.
 - Avec D4, on induit de l'épiderme, [**pas de neurectoderme**], du mésoderme **ventral** (*mésenchyme, cellules sanguines*) et de l'endoderme.
- Si on met la zone marginale en culture, on a mise en place d'épiderme, de neurectoderme et de mésoderme : il y a déjà eu induction de la part des macromères végétatifs.

Il s'avère donc qu'au stade 32 cellules, l'endoderme est déjà déterminé, il induit la calotte animale à donner soit du mésoderme ventral, soit du mésoderme dorsal : pour cela, il **secrète des molécules diffusibles** (inducteurs du m. ventral ou dorsal).



2) Expérience de Nieuwkoop

On prend un premier embryon, qui se développe normalement, présentant les deux axes (céphalo-caudal et dorso-ventral).

On prend ensuite un deuxième embryon que l'on traite aux U.V. dans la région végétative, ce qui **bloque la polymérisation des microtubules**. Cela entraîne la formation d'un embryon ventralisé : pas de rotation de symétrisation, donc pas de mise en place de croissant dépigmenté : **pas de région dorsale**. Cet embryon est abortif, il ne se développera pas complètement.

On laisse le développement continuer jusqu'au stade 32 cellules, puis on prend le **blastomère D1 de l'embryon témoin**. On **transfère** alors cette cellule D1 sur l'embryon irradié, à la place d'un blastomère végétatif. On constate que **l'embryon irradié se développe normalement** : restauration de l'axe dorso-ventral.

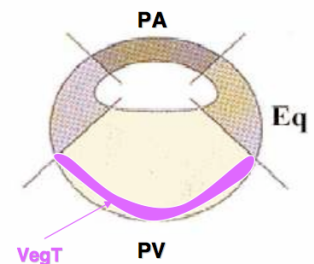
Ainsi, **D1 a induit une organisation embryonnaire complète**, et plus particulièrement l'induction du mésoderme dorsal.

Par des techniques de lignage cellulaire, on met en évidence que **D1 ne donne que de l'endoderme**.

L'endoderme est l'inducteur primaire du mésoderme, il est donc **déterminé avant la transition blastuléenne**. L'endoderme possède deux centres inducteurs : **D4 est le centre inducteur ventral, D1 le centre inducteur dorsal** (de Nieuwkoop).

Des **molécules d'origine maternelle** ont donc entraîné la mise en place de l'endoderme : on a mis en évidence que cette autodétermination se fait grâce à un **facteur de transcription, VegT**.

VegT est exprimé au niveau du **cortex végétatif** : en injectant un ARN antisens VegT, on empêche la formation de l'endoderme et une organisation correcte du mésoderme : ainsi, **VegT est essentiel à la mise en place de l'endoderme, il joue aussi sur l'organisation correcte du mésoderme**.



3) Expérience de Spemann

Cette expérience est réalisée au moment de la gastrulation : **on prélève la lèvre dorsale du blastopore** d'une jeune gastrula (nous sommes chez les tritons), que **l'on greffe au niveau ventral** d'un embryon receveur, au même stade de développement.

On constate que **le greffon s'invagine** et une deuxième lèvre dorsale se forme. L'embryon double présente **deux plaques neurales** : une plaque neurale primaire, située en position dorsale, et une autre plaque neurale, secondaire, en position ventrale de l'embryon, où a été implanté le greffon.

En coupe histologique, on peut identifier les cellules du receveur : **le receveur donne une petite partie des cellules de la chorde et une petite partie des somites de l'embryon secondaire** (les deux embryons sont parfaitement constitués).

Les cellules du greffon étaient déjà déterminées à donner du mésoderme dorsal.

Le centre organisateur de Spemann a différentes capacités inductrices : **neurogène, mésoblastogène**. Ainsi le receveur donne un embryon primaire normalement constitué, **le greffon poursuit son invagination et donne du chordomésoderme**.

- La zone du croissant dépigmenté en début de gastrulation représente donc le **champ morphogénétique**, déjà déterminé, du chordomésoderme.
- L'ectoblaste de l'embryon receveur aurait du fournir de l'épiderme ventral normal ; il édifie un **tube neural : le greffon exerce une induction neurogène sur le feuillet ectoblastique**.
- Le mésoblaste des lames latérales du receveur sert à **édifier la corde et les somites de l'embryon secondaire : le greffon a exercé une induction mésoblastogène d'ordre supérieur sur ce groupe de cellules**.
- L'évolution de l'endoderme du receveur n'est pas affecté : ce territoire était déjà déterminé.

Ces trois expériences montrent que l'induction du mésoderme est un **phénomène progressif**, avec tout d'abord l'inducteur primaire du mésoderme (le feuillet endodermique), qui émet des signaux dorsalisants et ventralisants, et dans un second temps, quand le chordomésoderme va être induit, la régionalisation progressive de la zone marginale par ce chordomésoderme.

4) Recherche des molécules inductrices

4.1 Technique *in vitro*

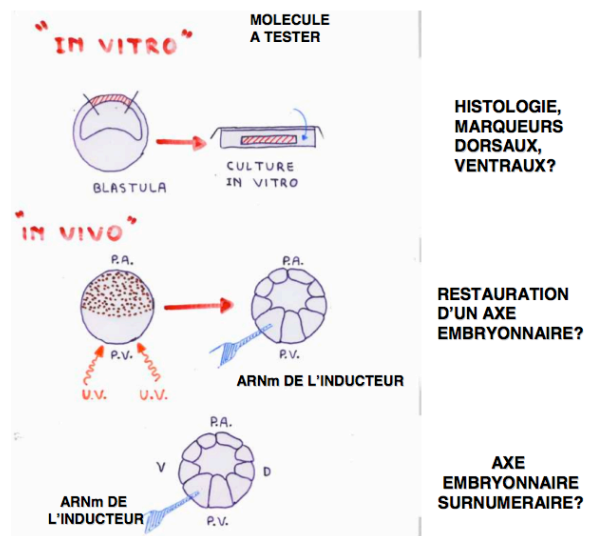
C'est la technique la plus simple : on prend un territoire compétent (le plus facilement appréhendable : **la calotte animale**), que l'on met en culture dans un **milieu salin** où l'on rajoute à différentes dose un inducteur potentiel. On regarde ensuite l'évolution histologique de la calotte animale, on peut extraire les ARN et faire un Northern Blot, hybrider avec différents types de sondes : marqueurs du mésoderme ventral, dorsal, ...

Toutefois, certaines molécules ont un rôle *in vitro*, mais pas de rôle *in vivo*.

4.2 Technique *in vivo*

Il existe deux façons de montrer que l'on a, par exemple, un inducteur du mésoderme dorsal :

- On prend un œuf que l'on traite aux UV : l'embryon sera ventralisé, abortif. On injecte alors l'ARNm de l'inducteur potentiel : si on a effectivement un inducteur primaire du mésoderme dorsal, on va **restaurer un axe embryonnaire**. L'inducteur mime parfaitement le centre de Nieuwkoop.
- Par contre, si la molécule est impliquée dans la mise en place du mésoderme dorsal, il se peut qu'elle ne puisse pas induire un axe harmonieux...
- On prend un embryon au stade 32 cellules et on injecte l'ARNm de l'inducteur potentiel au niveau du macromère le plus ventral (D4). S'il s'agit bien d'un inducteur primaire du mésoderme dorsal, alors il y aura **apparition d'un axe surnuméraire**.



Activine et FGF

Deux grandes familles de facteurs de croissance ont été ainsi étudiées:

- FGF : une famille de 23 membres.
- TGF- β : facteurs de croissance transformants, contenant l'**activine**, Vg-1...

On prend des calottes animales en culture et l'on injecte de l'activine ou du FGF :

- Sur le témoin, la calotte animale donne de l'**ectoderme** (épiderme) ;
- Avec de l'activine à forte dose, on s'aperçoit qu'il y a **induction de tissu nerveux** au niveau de l'ectoderme (+épiderme) et du **mésoderme dorsal** (chorde, muscle).
- Avec du FGF, il y a **induction du mésoderme ventral** (mésenchyme), et de l'ectoderme.

Ainsi, l'activine et le FGF sont des respectivement des inducteurs du mésoderme dorsal et ventral, *in vitro*. Il faut alors se demander si ces molécules sont exprimés chez l'embryon, au bon moment et au bon endroit.

4.3 Stratégies de « perte de fonction »

Pour étudier le rôle d'une molécule inductrice ou d'un facteur de transcription, on utilise différentes stratégies dites de « perte de fonction », visant à **éliminer le rôle fonctionnel de la protéine d'intérêt**.

a. Injection d'ARN antisens

On synthétise un ARN antisens complémentaire d'ARNm d'intérêt. On injecte, il y a hybridation : **pas de traduction** de la protéine d'intérêt et dégradation.

Mais l'utilisation de ces ARNs antisens a un inconvénient : très souvent ces ARNs vont s'hybrider mais ils **ne sont pas très stables**. On utilise donc des oligomorpholinos, qui sont des antisens composés de nucléotides chimiquement modifiés, et donc stables.

On peut aussi utiliser les ARNs d'interférence (**RNA Interference**).

Il existe au sein de la cellule des systèmes protéiques de dégradation (**RISC**) basé sur des petits ARNs double brins, les ARNs d'interférence. Ils peuvent se fixer par complémentarité aux ARNm et entraîner leur dégradation.

Ainsi, on injecte les **siRNA** (small interfering RNA) dans la cellule qui vont réagir avec les ARNm d'intérêt, et qui vont **provoquer leur dégradation par le RISC**. Il n'y alors **pas de traduction** de la protéine d'intérêt.

b. Expression de dominants négatifs

Pour empêcher le fonctionnement d'une protéine, d'un facteur de transcription ou d'un récepteur, on injecte en grande quantité au niveau de l'œuf fécondé un **ARNm codant pour la protéine tronquée**. On obtient donc une protéine non fonctionnelle, **dominante par rapport à la protéine endogène** qui devient minoritaire, et qui perd ainsi sa fonction (il y a **compétition** entre la protéine tronquée et la protéine endogène).

L'intérêt est que la protéine **n'est pas inhibée**, elle est toujours exprimée, car lorsque l'on inhibe la transcription d'un gène, il y a très souvent compensation.

Chez la souris en particulier, on peut invalider un gène (« knock-out ») et des phénomènes de compensation permettent à la souris de se comporter normalement.

IV- Induction et régionalisation du mésoderme

1) Trois grands types de molécules sont impliqués

Les facteurs de croissance sont des **molécules diffusibles** qui agissent au niveau de cellules cibles en se fixant sur des **récepteurs** transmembranaires. Ces récepteurs possèdent un domaine cytoplasmique à **activité protéine kinase**, impliqué dans la transduction du signal.

Les protéines de la famille Wnt sont des **glycoprotéines diffusibles**, riches en cystéines, qui agissent au niveau de cellules cibles en se fixant sur des récepteurs transmembranaires appartenant à la famille Frizzled, impliqués dans l'activation d'un coactivateur de la transcription, la β -caténine.

Les facteurs de transcription et leurs cofacteurs agissent au **niveau nucléaire**, dans les cellules où ils ont été synthétisés. Ils régulent l'expression de gènes spécifiques en se fixant à des **séquences cis régulatrices** sur le promoteur des gènes cibles.

2.1 Facteurs de croissance

Les signaux émis par l'endoderme déterminé induisent des cellules de l'hémisphère animal (zone marginale) en mésoderme. Ce sont des facteurs diffusibles de la famille **TGF- β** et **FGF**.

On a au niveau du centre inducteur dorsal (centre de Nieuwkoop) la présence de protéines de la famille TGF- β (**Vg1**, **activines**) et **Nodal** (Xnr : Xenopus nodal-related gene), **en forte concentration**.

Au niveau du centre inducteur ventral (endoderme ventro-latéral), on a les même molécules, mais **en faible concentration**, et des protéines de la famille FGF. Le rôle des FGF est cependant plus limité.

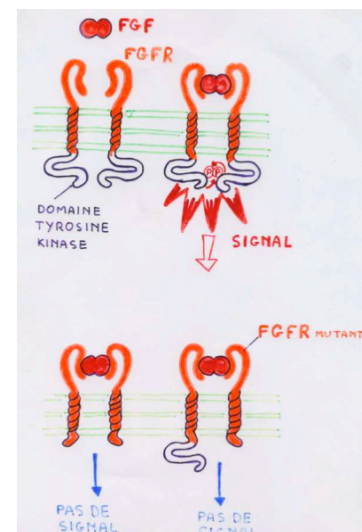
Ainsi l'induction du mésoderme est due à un gradient de production de molécules de la famille TGF- β , qui est croissant de la région endodermique ventrale à la région endodermique dorsale.

Voie des FGF : voie des MAP-Kinases (cf. cycle cellulaire)

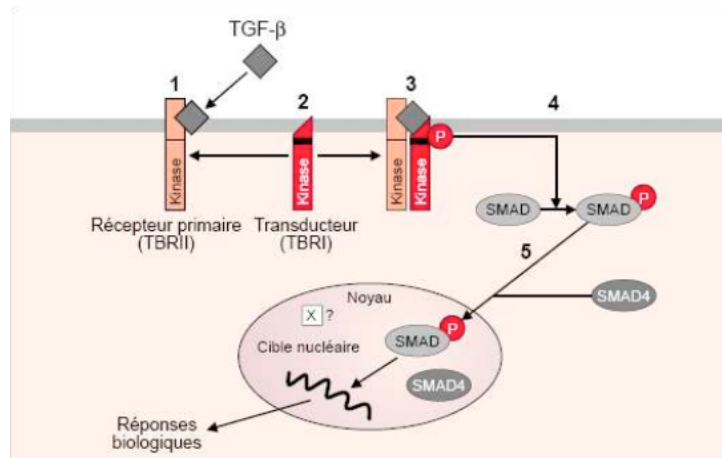
Les récepteurs aux FGF sont des récepteurs à **activité tyrosine kinase**, effectuant la transduction du signal.

Pour éliminer la fonction du FGF, on peut injecter des dominants négatifs de ce récepteur (FGFR mutant) qui sont des **récepteurs sans activité kinasique**. Il n'y alors pas de transduction du signal lorsqu'il y a dimérisation au signal de FGF.

La cellule se développe sans l'effet de FGF.



Voie des TGF- β

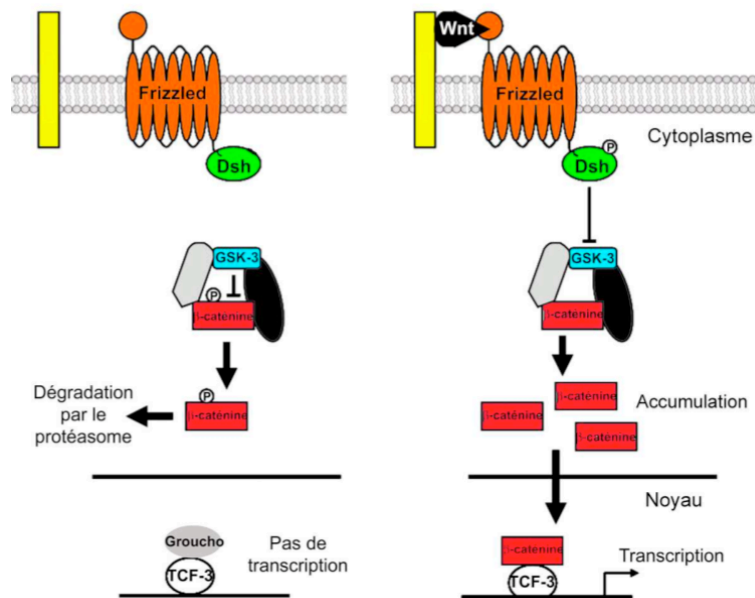


Les récepteurs transmembranaires sont des hétérodimères formés par un récepteur primaire, **TBR1** et un transducteur, **TBR2**. Lorsqu'il y a reconnaissance du ligand et hétérodimérisation des récepteurs, il y a autophosphorylation : le récepteur possède une activité Ser/Thr kinase au niveau hyalo-plasmique. Il y a ensuite phosphorylation d'un deuxième messager, **SMAD de type 1, 2, 3 ou 5** : le type de SMAD activé varie suivant le TGF- β reconnu.

Il y a alors transport du SMAD-P en direction du noyau par la protéine **SMAD4 (protéine cargo)**. Ce SMAD4 est donc essentiel à la transduction du signal.

SMAD-P agit comme un facteur de transcription : on a donc au final régulation de gènes cibles et donc différenciation de la cellule.

Signalisation Wnt/ β -caténine



Les protéines **Wnt** sont riches en cystéines. C'est le premier messager extracellulaire : ils viennent s'associer à un récepteur, **Frizzled** qui possède 7 régions hydrophobe. Le domaine extracellulaire, N-Terminal, est également riche en cystéines : c'est là qu'il y aura l'association Wnt-Frizzled. Mais pour que la signalisation Wnt soit fonctionnelle, il faut un **corécepteur** (qui est une lipoprotéine).

On a donc formation d'un **complexe ternaire : corécepteur + Frizzled + Wnt**.

Il y a alors transduction du signal : intervention d'une protéine G (interrupteur moléculaire) et du messager intracellulaire, la protéine hyaloplasmique **Dsh**. Dans ces conditions de transduction (complexe ternaire), il va y avoir phosphorylation de Dsh (Dsh-P). Dsh-P va acquérir une conformation active, elle va **inhiber** le fonctionnement d'une glycogène synthétase kinase, **GSK-3**.

GSK-3 a pour rôle de phosphoryler la β -caténine, et c'est en fait la β -caténine non phosphorylée qui est active.

Ainsi, quand Dsh-P inhibe GSK-3, **β -caténine va être fonctionnelle** et va **s'accumuler** dans le hyaloplasme. A un moment donné, le coactivateur passe au niveau nucléaire où il rentre en compétition avec Groucho : activation de gènes cibles.

Lors qu'il n'y a pas de Wnt, la Dsh est inactive : il va y avoir phosphorylation de β -caténine (qui implique un complexe protéique, formé entre autre par GSK-3).

La forme phosphorylée de β -caténine est peu stable, elle va tout de suite être dégradée par le protéasome. Pas de transcription.

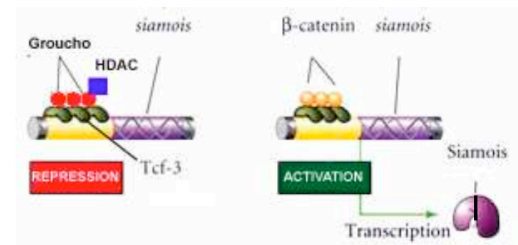
1.2 Facteurs de Transcription

VegT a un rôle crucial au niveau de l'autodétermination de l'endoderme, et joue sur la mise en place du mésoderme.

La β -caténine est un coactivateur localisé dans la région dorso-végétative. Elle a peut-être le rôle le plus important dans l'induction primaire du mésoderme. Elle joue un rôle clé dans la mise en place du mésoderme dorsal.

Siamois est un facteur de transcription, localisé dans la région dorso-végétative sous contrôle de la β -caténine. *Siamois* est un gène embryonnaire.

Il faut comprendre que l'induction du mésoderme est causé par la cascade d'activation de gènes : tout d'abord des transcrits d'origine maternelle, puis après la transition blastuléenne, des gènes embryonnaires seront activés.



1.3 Déterminants cytoplasmique (œuf de xénope)

In vivo, dans l'œuf de xénope non fécondé, on observe une **répartition homogène de la β -caténine** dans le cytoplasme. On met en évidence la **présence de transcrit Vg1 et VegT au niveau du cytoplasme cortical et végétatif**.

A la fécondation, on a la rotation de symétrisation : bascule de pigments, et mise en place des faisceaux des microtubules au niveau du cortex et **redistribution** des dominants cytoplasmiques (Vg1, β -caténine, ...)

Ces déterminants cytoplasmiques se retrouvent localisés dans la région dorsale de l'embryon.

Avec la rotation corticale, il y a la mise en place de l'axe dorso-ventral et du plan de symétrie bilatérale.

2) Induction du mésoderme

C'est un mécanisme complexe qui résulte de l'intégration de **voies de signalisation multiples** impliquant des facteurs d'origine **maternelle** et des facteurs d'origine **zygotique**, exprimés après la transition blastuléenne.

2.1 Rôle de la β -caténine

La β -caténine est le **facteur maître** qui intervient dans la mise en place du **mésoderme**. C'est un coactivateur de la transcription d'origine maternelle, réparti de manière **homogène** dans le cytoplasme avant la fécondation.

Au moment de la fécondation, la β -caténine vient se localiser à la région **dorsale** et **dorsovégétative**, et du stade 2 à 4 blastomères, la protéine est hyaloplasmique. Dans un second temps, à partir du stade 16 blastomère, la β -caténine **se stabilise** à la région **dorsale** et passe dans au niveau nucléaire : il y a activation de gènes à partir de la transition blastuléenne.

Si l'on traite l'embryon aux UV, et que l'on empêche la rotation de symétrisation, il n'y aura jamais de noyau dorsal exprimant la β -caténine : cette **rotation de symétrisation est essentielle** à la stabilisation dorsale de la protéine.

On peut montrer aussi, en utilisant un oligomorpholino spécifique, que **la β -caténine est essentielle à la mise en place du mésoderme dorsal** (du chordomésoderme). De plus si on injecte le transcrit au stade 32 cellules de l'embryon dans D4, **on mime l'expérience de Spemann** : apparition d'un axe surnuméraire.

On pourrait donc s'attendre à ce que la β -caténine soit un inducteur primaire du mésoderme dorsal. Toutefois, la voie de signalisation est celle de **Wnt/ β -caténine** : il existe une autre protéine, de la famille Wnt, permettant la stabilisation de β -caténine.

X-Wnt8 est un membre de la famille Wnt, qui s'exprime durant la gastrulation, au niveau du mésoderme ventral. En faisant une expérience *in vivo*, on entraîne la mise en place d'un axe surnuméraire. Toutefois, **X-Wnt8 n'est pas une protéine d'origine maternelle**, elle ne s'exprime donc pas durant la gastrulation.

X-Wnt8 ne permet pas la stabilisation de la β -caténine lors de la segmentation.

C'est en fait la protéine **Wnt11** qui est impliquée dans cette voie de signalisation.

Événements moléculaires conduisant à l'enrichissement en β -caténine de la région dorsale de l'œuf :

L'œuf non fécondé possède différents déterminants cytoplasmiques (Vg1, VegT, Dsh). La β -caténine est homogène dans le hyaloplasme, et on met en évidence du **transcrit Wnt11**.

Lors de la rotation corticale, il y a mise en place des microtubules et **redistribution des déterminants cytoplasmiques**. Dsh et le transcrit Wnt11 sont transportés (par des kinésines) vers la région dorsale de l'embryon. Au fil de la segmentation, les cellules de cette région auront donc du Dsh, du transcrit Wnt11 et on s'aperçoit que ce transcrit est rapidement traduit. **Wnt11 est sécrété et entraîne l'activation de Dsh dans la région dorsale**.

A ce moment là, Dsh actif inhibe GSK-3 et on va avoir accumulation de β -caténine stable dans les cellules de cette région dorsale.

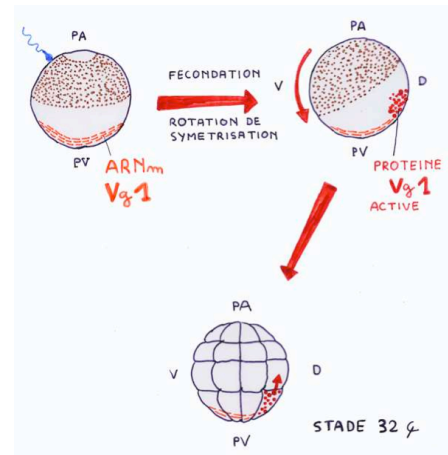
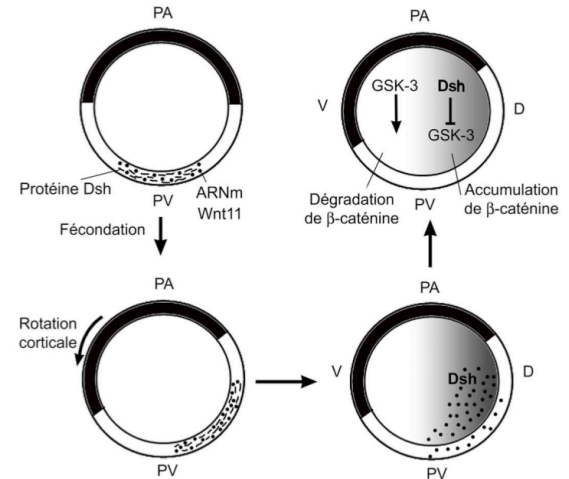
Finalement, au stade 16 cellules, β -caténine passe au niveau nucléaire et active des gènes cibles lors de la transition blastuléenne.

2.2 Rôle de Vg1

Vg1 est un facteur de croissance, de la famille des **TGF- β** , d'origine maternelle. Suite à la rotation de symétrisation, Vg1 se localise (strictement) à la région dorsovégétale. Vg1 s'accumule et est activée par son clivage.

Au stade 32 cellules, Vg1 se retrouve dans le blastomère **D1** et est sécrétée : elle induit les cellules qui lui sont proche (**zone marginale dorsale**) à se déterminer en mésoderme.

Si l'on injecte l'ARNm **VG1** au niveau de **D4**, il y a formation d'un axe surnuméraire.



Famille	Molécule	Origine	Induction...
FGF		maternelle	<i>In vitro</i> , de mésoderme ventral
TGF- β	Vg1	maternelle	- d'un axe surnuméraire, - <i>in vitro</i> , à forte concentration, de mésoderme ventral
	Activine	embryonnaire (exprimé après la TB)	- <i>in vitro</i> , l'inducteur le plus puissant de mésoderme, - d'un axe surnuméraire <u>incomplet</u> .
	Nodal	embryonnaire	- à forte concentration, de mésoderme dorsal
FT	β -caténine	maternelle	- d'un axe surnuméraire, - de mésoderme dorsal
	Siamois	embryonnaire	Sous contrôle de la voie Wnt/ β -caténine, - d'un axe surnuméraire, - de mésoderme dorsal

⇒ **Durant la segmentation, les déterminants cytoplasmiques d'origine maternelle** (β -caténine, Vg1, VegT) **entraînent l'expression zygotique d'inducteurs du mésoderme** (TGF- β : Xnr, activine) **au niveau de l'endoderme.**

Il y a un gradient d'expression des protéines **Nodal** de la région de l'endoderme ventral à l'endoderme dorsal :

- Au niveau dorsal, Vg1 + β -caténine + VegT → Nodal et activine → Mésoderme dorsal
- Au niveau ventral, Vg1 (faible qté) + VegT → Nodal, activine (faible qté) → Mésoderme ventral

Nodal et activine sont des morphogènes, c'est-à-dire des molécules **diffusibles**, agissant sur des cellules cibles en **activant des gènes différents suivant un effet dose**.

Si on inhibe la signalisation Nodal, on observe qu'il n'y a pas d'induction de mésoderme du tout. Une seule famille de molécules permet d'induire du mésoderme ventral et dorsal : à quoi servent les inducteurs ventralisants, comme FGF ? (Multifactorialité de l'induction)

2.3 Théorie des trois signaux...

L'induction du mésoderme est un **phénomène progressif**. Au stade 32 cellules, on a de l'endoderme déterminé qui produit un **gradient de protéines diffusibles de la famille TGF- β** (activine, Vg1, Xnr), **croissant de l'endoderme ventral à l'endoderme dorsal**. On a également au niveau du centre de Nieuwkoop expression de la β -caténine, puis après la transition blastuléenne, de Siamois. Au niveau du centre inducteur ventral, on a une faible concentration de TGF- β et du FGF.

Cela a amené la théorie des trois signaux :

- l'endoderme déterminé avant la transition blastuléenne émet **un signal ventralisant et un signal dorsalisant** (premier et deuxième signal),
- en fin de segmentation, le premier territoire mésodermique est déterminé : le **chordomésoderme** (expérience de Spemann), qui **secrète donc forcément des inducteurs secondaires**. Il y a régionalisation de la zone marginale.

On s'aperçoit que cette zone marginale, en fin de segmentation, exprime toute une série de facteurs de transcription, dont **Xbra** et **Goosecoïd**.

Xbrachyury est exprimé dans toute la zone marginale, et *in vitro*, entraîne la formation de mésenchyme. Son expression est **sous contrôle de FGF et de TGF- β (en faible quantité)**. C'est un **marqueur pan-mésodermique**.

Goosecoïd est exprimé dans **un premier temps** uniquement dans la zone marginale **dorsale** (au niveau de Spemann : chordomésoderme). Puis son ARNm est réparti suivant **un gradient dorso-ventral décroissant** (de la chorde, en passant par les muscles, au pronephros = rein primitif).

Si on injecte le transcrit Goosecoïd au niveau de la zone marginale ventrale, on a formation d'un axe embryonnaire surnuméraire (mime l'organisateur de Spemann).

L'expression de *Goosecoïd* est **sous contrôle de l'activine, de Vg1 et de Xnr en quantité importante**.

Quel est l'inducteur secondaire qui a expliqué l'induction neurogène et mésoblastogène d'ordre supérieur ?

2.4 Gastrulation – réalisation du patron mésodermique

La zone marginale se détermine progressivement et on a la régionalisation du mésoderme.

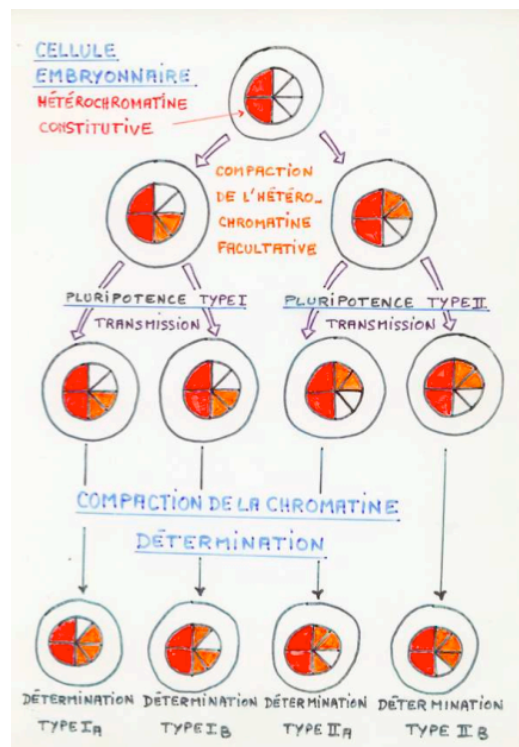
L'organisateur de Spemann produit au moins deux molécules, correspondant à un signal dorsalisant : **Chordin** et **Noggin**, suivant un **gradient décroissant de la région dorsale à la région ventrale**. Ces molécules, diffusibles, sont **assimilables à des facteurs de transcription**, mais elles ne possèdent **pas de récepteurs**.

Il existe donc un 4^o signal, véritable signal inducteur secondaire du mésoderme, qui est produit **par le mésoderme ventral durant la gastrulation**.

Un membre de la famille des TGF- β , **BMP4** est produit suivant **un gradient décroissant de la région ventrale à la région dorsale**, avec **Wnt8**.

Ainsi la régionalisation du mésoderme se fait grâce à des gradients opposés de molécules qui s'annulent : BMP-4 va s'associer physiquement à Noggin ou à Chordin, ce qui va inhiber sa fonction entre la région dorsale et la région ventrale de la zone marginale. En fin de gastrulation, le mésoderme est déterminé.

La cellule déterminée ne peut plus être à l'origine que d'une gamme limitée et précise de types cellulaires. C'est un état **stable et transmissible**. Il y aura **limitation progressive de la capacité d'expression du génôme** (hétérochromatisation). Elle ne possède pas de caractère morphologique visible.



La différenciation : la cellule possède des caractères spécialisés immédiatement discernables, et a perdu son pouvoir mitotique. En plus des gènes de routine, la cellule différenciée n'utilise que 1 à 2% du programme génétique (gènes de luxe).

V- Mise en place du neur ectoderme

1) Induction du neur ectoderme

Expérience d'exogastrulation

On plonge l'embryon, au début de la gastrulation, dans une **solution saline** : il n'y aura pas d'invagination, mais au contraire, il y aura un phénomène d'élongation.

Il y a mise en place d'un territoire ectodermique et endodermique, mais **pas de neur ectoderme**.

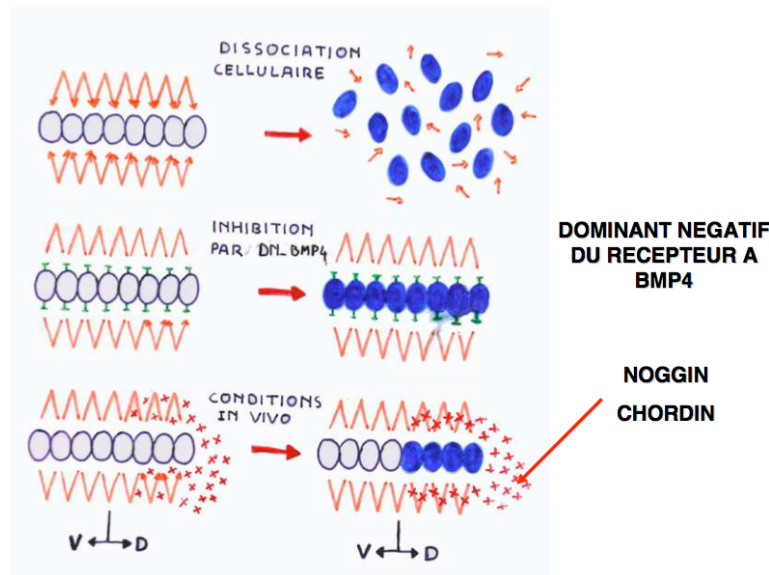
On l'avait expliqué par l'absence de contact entre le mésoderme et l'épiderme : on a donc cherché des inducteurs du neur ectoderme produit par le mésoderme dorsal, sans jamais en trouver...

On a donc conduit une deuxième expérience, dans laquelle on joue sur la calotte animale :

- témoin : la calotte animale en culture donne de l'épiderme,
- après dissociation des micromères et réassociation, on obtient du tissu neural.

Finalement, lors de la dissociation, **on a dilué les molécules inductrices de l'épiderme**, secrétés par les cellules de la calotte animale et il y a eu **différenciation en neur ectoderme par défaut**.

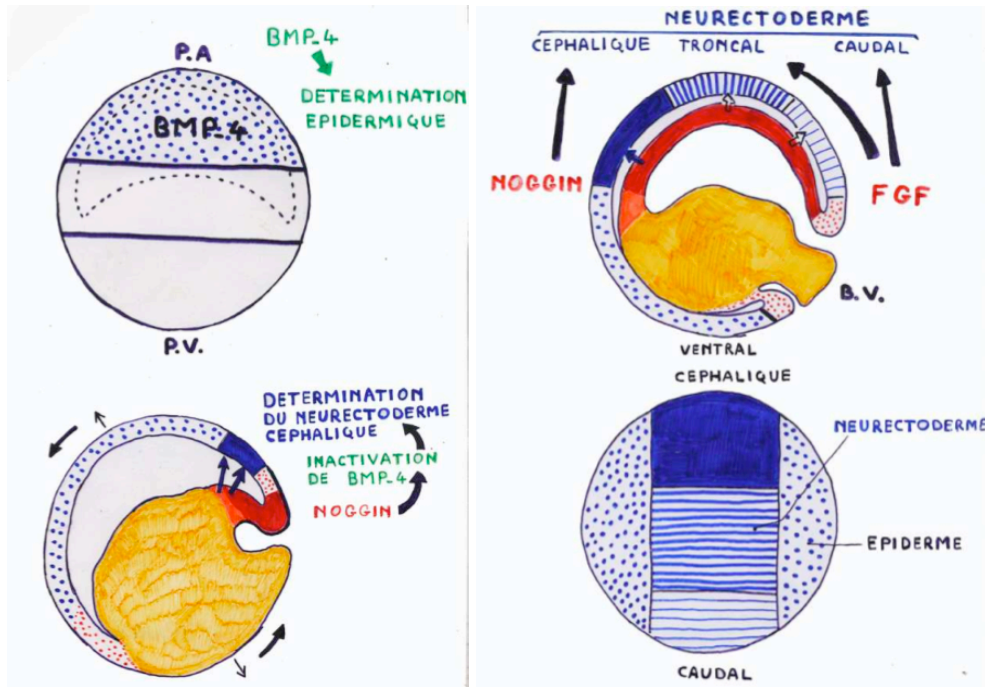
On a mis en évidence que l'inducteur de l'épiderme est BMP4 (de la famille des TGF- β).



2) Détermination et régionalisation du tube neural

En fin de gastrulation on assiste à la spécialisation du neur ectoderme suivant un axe antéro-postérieur. Le **mésoderme caudal**, dernier territoire à s'invaginer, va produire le **facteur de croissance FGF** selon un **gradient planaire décroissant de la région caudale en direction de la région céphalique**.

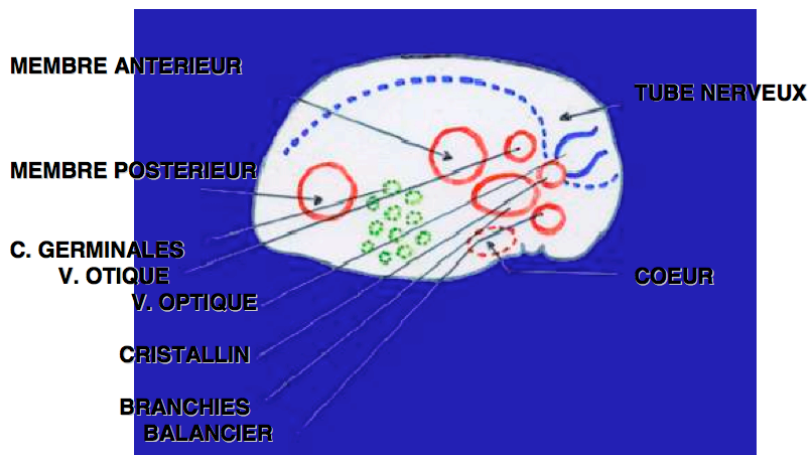
FGF va donc jouer sur la régionalisation du neur ectoderme. Lorsqu'il y a beaucoup de FGF, il y a formation de **neur ectoderme caudal**, lorsqu'il y a moins de FGF, il y a formation de **neur ectoderme troncal**, et enfin lorsqu'il n'y a pas de FGF, il y a formation de **neur ectoderme céphalique**. **Noggin** et **Chordin** sont émises en **gradient vertical** elles participent - avec le gradient planaire de FGF - à la détermination et la régionalisation du tube neural.



3) Organogenèse

L'organogenèse est une **cascade d'inductions successives** : des groupes de territoires déterminés se mettent en place de proche en proche dans l'embryon, de la gastrula au bourgeon caudal.

Les champs morphogénétiques sont des **groupes de cellules pluripotentes dont l'avenir est orienté de façon irréversible**. Leur capacité de régulation est réduite, mais il n'y a pas de différenciation morphologique visible.



ANNEXES

BIOLOGIE CELLULAIRE

Liste des inhibiteurs

<i>Inhibiteur</i>	<i>Cible, mécanisme inhibé(e)...</i>
Inhibiteur de la thymidine kinase	Bloque la cellule en phase S
Actinomycine D	Transcription (bactérie + eucaryote)
α -amanitine	ARNm Pol I : insensible II : à faible concentration III : à forte concentration (eucaryote)
Puromycine	Traduction
Cycloheximide	Inhibe la synthèse protéique dans le cytoplasme (eucaryote)
Tétracycline, streptomycine, érythromycine	Bloque la traduction chez les bactéries
Rifamycine	Bloque la transcription chez les bactéries
Digitaline, Ouabaïne	Pompe Na/K (fixation sur les récepteurs K ⁺)
Chloramphénicol	Synthèse des protéines dans les mitochondries (inhibe l'activité des mitoribosomes)
Roténone (Insecticide)	Bloque le complexe I (NADH Déshydrogénase) : réduit fortement la synthèse d'ATP
Antimycine	Bloque le complexe III : pas de transfert d'électron, pas de synthèse d'ATP
Cyanure (KCN)	Bloque le complexe IV (cytochrome oxydase a + a ₃) : pas de gradient de protons, pas de synthèse d'ATP
Dinitrophénol (Ionophore H ⁺) <i>Agent découplant</i>	Transporte les H ⁺ à travers la mb interne suivant le gradient électrochimique, sans passer par le complexe F ₀ /F ₁ (Cycle court-circuité). Annule la synthèse d'ATP.
Oligomycine	Bloque de l'ATPase F ₀ : transfert d'électrons, formation du gradient, pas de synthèse d'ATP
Taxol (Taxane extrait de l'if);	Effet toxique <i>in vivo</i> , empêche la dépolymérisation des microtubules. (blocage des fonctions motrices)
Vinblastine – Vincristine (Alcaloïdes extraits de la pervenche)	Immobilisent les tubulines hyaloplasmiques libres sous forme de cristal : empêche la polymérisation. Disparition des microtubules.
Colchicine – Colcémide – Nocodazole	(Alcaloïdes extraits du colchique) Se lient aux hétérodimères de tubuline libre. Bloque la polymérisation (disparition)
Cytochalasine	Microfilaments d'actine : bloque leurs polymérisation à l'extrémité + . (In vivo : contraction)
Phalloïdine	Provoque la polymérisation, empêche la dépol des μ F d'actine.

Urée	Dissociation des microfilaments intermédiaires
Rayonnements radiomimétiques (UV, ionisants)	Réplication
CKI	Inhibiteurs de Kinases cyclines dépendantes

Liste des colorants

<i>Colorant</i>	<i>Cible, couleur</i>
(T) Hémalum / Éosine	Hémalum : colorant basique (colore les structures acides basophiles) Éosine : colorant acide (colore les structures basiques acidophiles)
(T) May-Grunwald / Giemsa	Giemsa : colorant basique (éosine + azur de méthylène), May-Grunwald : colorant acide (éosine + bleu de méthylène)
(H) Acide Périodique-Schiff	Chaînes polysaccharidiques (rouge fuschia)
(T) Bleu de Toluidine	Colorant basique
(T) Hématoxiline	Colorant basique
(T) Fuschine basique	Colorant basique rouge violacé
(T) Fuschine acide	Colorant incolore, rosi par réduction
(H) Feulgen	ADN : rouge
(H) Brachet	ADN : vert, ARN : rouge
BET	Agent intercalant révélé par UV (ADN)
Vert Janus	Principal colorant du chondriome
Bromure d'éthidium et DiOC6	ADN Nucléaire : rouge, Mitochondrie : vert, ADN Mitochondrial : jaune
Rouge ponceau (Western Blot, SDS-PAGE)	Protéines
Bleu de Coomassie (SDS-PAGE)	Protéines
Bleu de Nils	<i>Utilisé pour les marques colorées</i>

Marqueurs fluorescents :
DAPI (bleu), rhodamine (rouge), fluorescéine (vert)

CHONDRIOME

CHAÎNE RESPIRATOIRE

Transporteurs d'électrons

Une douzaine de transporteurs d'électrons, regroupés en 4 types de composés multi protéiques :

- Déshydrogénases Flavo-Protéiques
FMN + FeS – Transportent 2 électrons.
- Cytochromes
Hèmes (groupement prosthétique: coenzyme lié de façon stable à l'enzyme) : Porphyrine Fer et/ou Cu^{2+} (Transportent 1 électron)
- Protéines Fer Souffre (FeS) : 1 électron
- Ubiquinone ou CoQ : liposoluble et non lié à une protéine, transporteur mobile de 1 ou 2 électrons. Isoprénoïde.

Protéines intrinsèques de la membrane interne Complexes transporteurs d'électrons

Complexe I : NADH Déshydrogénase, ou NADH CoQ Réductase

Complexe lipoprotéique transmembranaire, de poids moléculaire 85kDa (40 polypeptides). Accepteur d'électrons grâce à la flavine et de plusieurs FeS

Complexe II: Succinate Déshydrogénase (enzyme du cycle de Krebs), ou Succinate CoQ Réductase, FADH2 Déshydrogénase

Complexe lipoprotéique **NON** transmembranaire. PM = 14 kDa. 4 ppept.

Transporte les électrons grâce à la flavine et 2 FeS.

Complexe III: Cytochrome b+c1, ou CoQ H2-Cytochrome c Réductase

Dimère lipoprotéique transmembranaire. 250 kDa, 20 ppept.

Transporteurs d'électrons: 2x3 hèmes (b – c1) + 2 FeS

Complexe IV: Cytochrome [c] oxydase a+a3

Dimère lipoprotéique transmembranaire. 160 kDa, 24 ppept.

Transporteurs d'électrons : 2 hèmes (a – a3) + 2 ions Cuivre

Transporteurs mobiles

Du complexe I ou II au complexe III : CoQ

*Du complexe III au complexe IV : **Cytochrome c** (soluble, 13kDa, 100 aa + 1 hème), qui est faiblement lié à la membrane interne.*

Complexe F0/F1 : ATPase. PM = 500 kDa

Complexe formé de deux entités structurales : F0 {a, b, c, e, g} et F1 { α , β , γ , δ , ϵ }

Les sous-unités c et γ constituent un **rotor moléculaire** (100 t/s) : le sens de rotation est déterminé par le sens du passage des protons H^+ à travers F0.

Rotation $\rightarrow$ Changements de conformations des SU $\beta \rightarrow$ Fixation de l'ADP et du P_i sur les SU $\beta \rightarrow$

Synthèse d'ATP (Chambre interne)

a et b font saillie sur la face matricielle de la MI ; α , β , δ , et ϵ maintiennent la cohésion de F0/F1

CYTOSQUELETTE MICROTUBULES

Les microtubules sont composés d'hétérodimères de tubulines α et β . Chaque tubuline possède un site de fixation au GTP, et fait 55kDa pour 450aa. Le diamètre de l'hétérodimère est de l'ordre de 5 à 8nm.

La polymérisation des hétérodimères nécessite du GTP; le protofilament présente une polarité :
COMT – (-) $\alpha\beta$ - $\alpha\beta$ - $\alpha\beta$ - $\alpha\beta$ - ... - $\alpha\beta$ (+)

Un microtubule est composé de 13 protofilaments. Son diamètre interne est de 14nm, son diamètre externe 24nm. Il peut être long de 1 à 25 μ m.

MICROFILAMENTS

Il existe trois types de microfilaments : d'actine, de myosine, et intermédiaires.

Protéines constituant les microfilaments

<i>Protéine</i>	<i>Caractéristiques</i>
Actine G	42 kDa, 376aa – D : 5-7 nm ; Sites de reconnaissance Mg^{2+} , K^+ , ATP ; Forme en haltère ; 50% des actines
Actine F	Microfilament pseudo-hélicoïdal ; D : 5-7 nm ; Pas de l'hélice : 36nm
Myosine II	15nm, 500 kDa ; Deux chaînes lourdes (200kDa, Tête N-term ATPasique, corps en hélice α), deux paires de chaînes légères (2 ppept : 17 kda, 170aa ; 19kDa, 190aa)
Microfilaments intermédiaires	D : 10 nm ; Longueur des dimères 45 nm ; Spécificité : ϕ épithéliales : kératine – fibroblastes : vimentine – neurones : neurofilaments – cellules musculaires : (actine α), desmine

Protéines associées aux filaments d'actine

<i>Ancrage</i>	<i>Fasciculation</i>	<i>Fragmentation</i>	<i>Réticulation</i>
- vinculine (130), - α -actinine (190), Plaquette d'adhésion : spectrine et ankyrine	- fimbrine (68), - gelsoline (90), - villine (95), - α -actinine	gelsoline (Ca^{2+})	filamine (250)

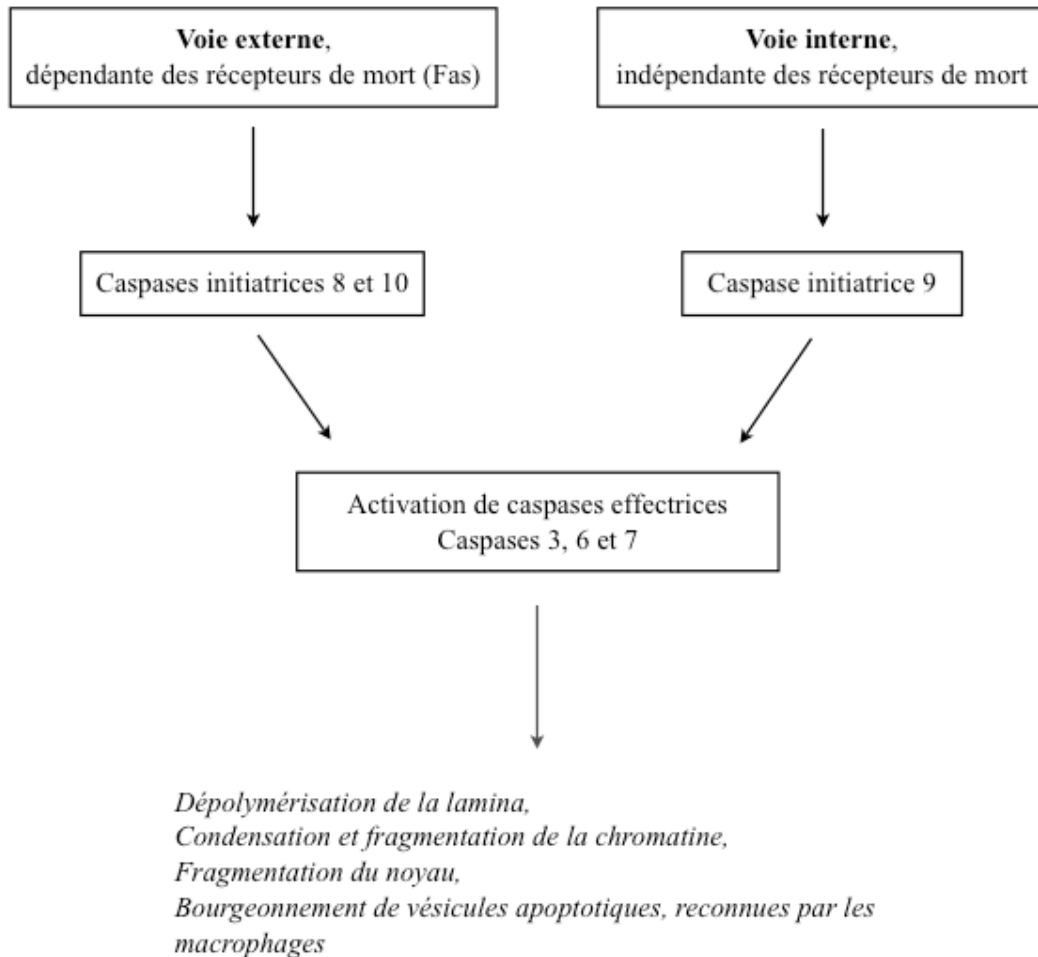
Protéines associées aux filaments de myosine

Troponine et tropomyosine (ϕ musculaires)

APOPTOSE

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, se fait suivant **deux voies**, impliquant une cascade d'activation de protéines appelées caspases, qui sont des **protéases à cystéine**. Le clivage se fait après un résidu **acide aspartique** (D).

Les deux voies de l'apoptose

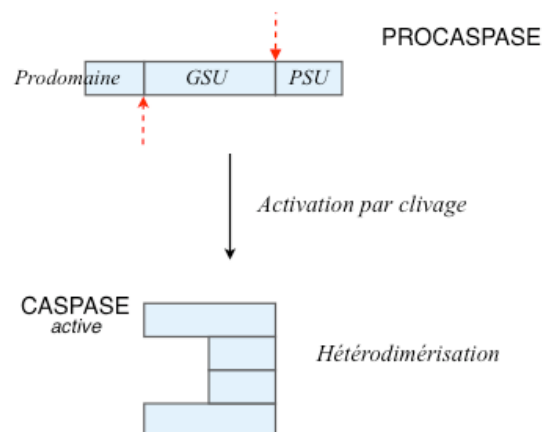


La caspase

Une caspase se trouve initialement à l'état de procaspase, proenzyme inactive, formée de trois sous-unités (prodomaine N-terminal, grande sous-unité de 20kDa, petite sous-unité de 10kDa).

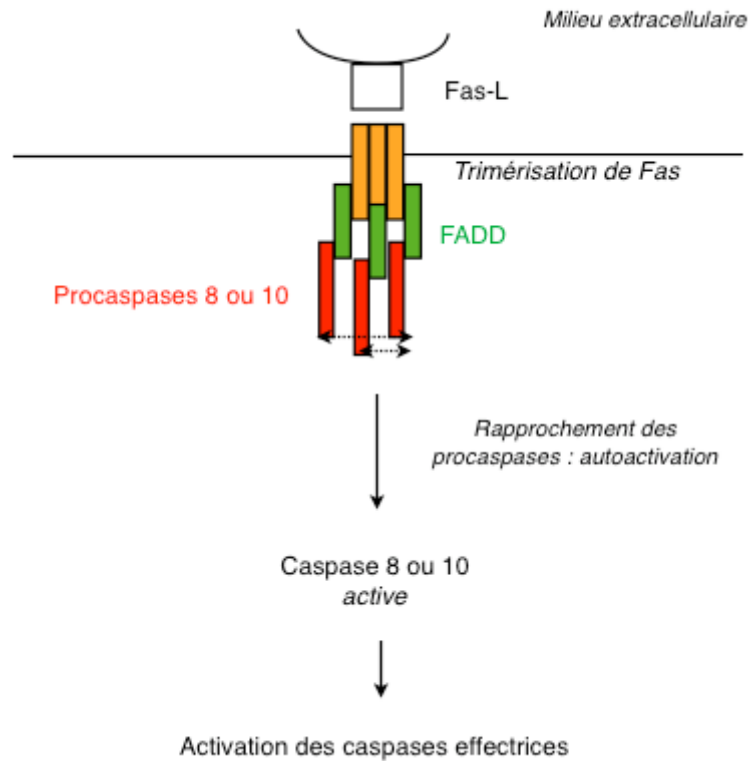
Le signal apoptotique se fait par clivage de la procaspase, et hétérodimérisation de 2 GSU + 2 PSU.

Il existe différents types de caspases, les caspases initiatrices (8, 9, 10), qui s'auto-activent, et les caspases effectrices (3, 6, et 7).

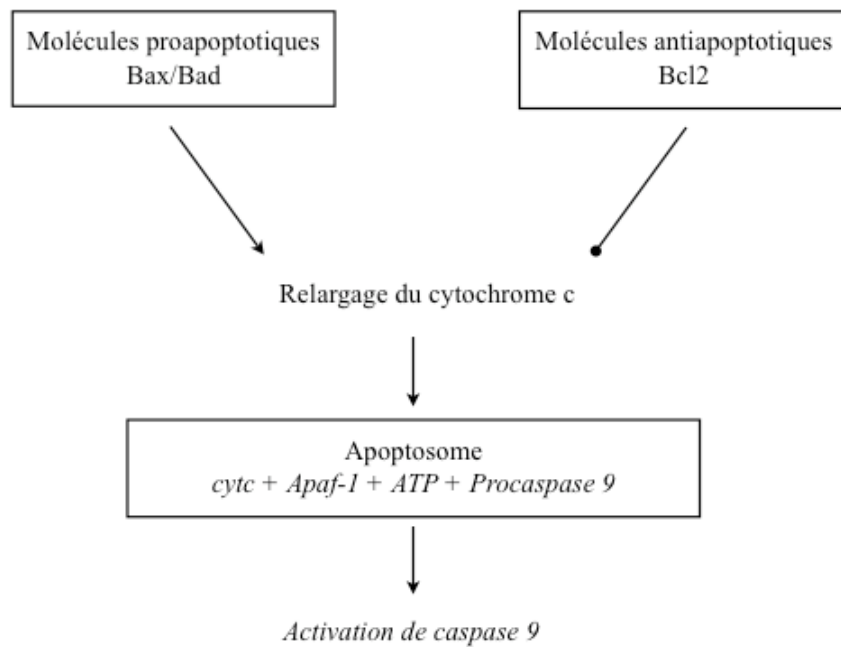


Activation des caspases initiatrices

- Voie externe :



- Voie interne :



ACIDES AMINÉS

200 types différents d'acides aminés, 20 types majoritaires

Alanine (ALA/A)	Leucine (LEU/L)
Arginine (ARG/R)	Lysine (LYS/K)
Asparagine (ASN/N)	Méthionine (MET/M)
Acide Aspartique (ASP/E)	Phénylalanine (PHE/F)
Cystéine (CYS/C)	Proline (PRO/P)
Glutamine (GLN/Q)	Sérine (SER/S)
Acide Glutaminique (GLU/D)	Thréonine (THR/T)
Glycine (GLY/G)	Tryptophane (TRP/W)
Histidine (HIS/H)	Tyrosine (TYR/Y)
Isoleucine (ILE/I)	Valine (VAL/V)

Chaînes latérales : 10 Hydrophiles / 10 Hydrophobes

3 Basiques — 2 Acides – 5 Polaires Neutres / 10 Non polaires

Acides aminés hydrophobes

ACGILMFPVW — ALA, CYS, GLY, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, TRP, VAL — Alanine, Cystéine, Glycine, Isoleucine, Leucine, Méthionine, Phénylalanine, Proline, Tryptophane, Valine

NOTES GÉNÉRALES

Inclusion

MP : paraffine (coupes fines)

Résines (MET) : épon, araldite, vestopal

Toluène: permet d'enlever la paraffine

Détergents

Doux: Triton (WR 1399), NP6 et NP12, lubrol, digitonine

Forts : SDS (Dodécyl Sulfate de sodium) + saponine (doux, fort ?)

Et puis...

EDTA, trypsine, collagène : permettent la dissociation cellulaire

β -mercaptoéthanol : rompeur de liaisons disulfures

FISH : Fluorescent In Situ Hybridation

Bromodeoxyuridine : nucléoside analogue à la thymidine

Liquide de Boin : mélange alcool-acide-formol (tue les cellules, sans qu'il n'y ait nécrose)

ANNEXES

ANATOMIE

Colonne Vertébrale

Variations cervicales : Atlas et axis forment la charnière crânio-vertébrale.

Atlas (C1) présente des masses latérales; Axis (C2) la dent de l'axis (processus odontoïde); C7 possède un processus épineux long, unituberculeux, proéminent, et facilement palpable.

Variations thoraciques : T11 et T12 n'ont pas de surface articulaire costale.

Colonne fixe : le sacrum (os impair, médian) est la fusion des 5 vertèbres sacrales, le coccyx est la fusion des 4 à 5 éléments coccygiens. La base du sacrum s'articule avec les os coxaux par les surfaces auriculaires. Le sommet du sacrum s'articule avec la base du coccyx. Les processus articulaires supérieurs s'articulent avec les proc. art. inférieurs de L5.

La face ventrale du sacrum est lisse. Les 4 foramens sacraux ventraux laissent passer les rameaux ventraux des nerfs spinaux sacraux. (Idem Dorsaux)

Le 5^{ème} nerf spinal sacral naît entre le sacrum et le coccyx.

Courbures : lordose cervicale (convexe en avant, C5) ; cyphose thoracique (concave en avant, T6); lordose lombaire (convexe en avant, L3).

Le sacrum présente une concavité vers l'avant. Le promontoire correspond au bord supérieur de la 1^{ère} vertèbre sacrale.

Processus articulaires : jointures synoviales ;

Lames reliées par des ligaments jaunes (élastiques) ;

Processus transverses ou épineux reliés par des ligaments ou des muscles (inter-transversaires ou inter-épineux) ;

Chaque segment de la colonne a une mobilité qui va en diminuant de haut en bas.

Mouvement global : Flexion 120°, Extension 145°, Rotation 90°, Latéralité 75°.

La moelle spinale va de C1 à L2, puis queue de cheval.

Canal vertébral : SNC jusqu'en L2 (moelle, racine) ; Méninges jusqu'en S2 (sac dural) ; Espace épidural et son contenu.

Foramen intervertébral : SNP- Nerf spinal, ganglion nerveux spinal (sensitif), artère segmentaire, veines intervertébrales, rameau méningé (SNΣ), graisse

Examen clinique — RX Standard : face profil $\frac{3}{4}$ – Scanner : os – IRM : disque.

Ponction lombaire : diag de la méningite ; prélèvement de liq. cérébro-spinal ; ponction dans le sac dural entre L4-L5 ou L3-L4.

Traversée : peau, ligament interépineux, ligament jaune, espace épidural, sac dural.

HORMONES

Axe hypothalamo-hypophysaire

- Hypothalamus-Neurohypophyse :
 - Ocytocine (sensibilise la musculature lisse),
 - Vasopressine (élève la pression artérielle et agit sur la réabsorption de l'eau)
- Hypothalamus-Adénohypophyse :
 - *Hormones effectrices* : somato- et mélanotrope,
 - *Hormones Glandotropes* : contrôle
 - *Gonadotropes* : FSH, LH, Prolactine,
 - *Non gonadotropes* : ACTH (surrénale), TSH (thyroïde)

Glandes thyroïde et parathyroïdes

- Hormones thyroïdiennes :
 - Thyroxine (T4) et tri-iodothyronine (T3) : régulation du métabolisme de base,
 - Calcitonine : hormone hypocalcémisante, stimule l'ostéogénèse
- Parathormone, seule hormone hypercalcémisante, qui stimule les ostéoclastes.

Pancréas

- Les îlots de Langerhans sécrètent trois types d'hormone
 - Glucagon (A/20%)
 - Insuline (B/80%)
 - Somatostatine (D/Rares)

Glandes surrénales

- Cortico-surrénale :
 - *Zone glomérulée* : glucocorticoïdes (cortisol),
 - *Zone fasciculée* : minéralocorticoïdes (aldostérone) – rétention de Na^+ ,
 - *Zone réticulée* : Androgènes (DHEA)
- Médullo-surrénale
 - *Cellule chromaffine* : adrénaline et noradrénaline

Hormones sexuelles

Spermatogenèse (poly bio)

- Anté-hypophyse : sécrétion d'hormones gonadotropes
 - ICSH (H° de Stimulation des Cellules Interstitielles) agit sur les cellules de Leydig,
 - les cellules de Leydig sécrètent la testostérone, qui agit sur les cellules de Sertoli et sur la fréquence de division des spermatogonies
 - FSH (H° Folliculostimulante) agit sur les cellules de Sertoli, synthétisant
 - des protéines de liaisons,
 - des mitogènesagissant sur la fréquence de division des spermatogonies.

La testostérone

- stimule la spermatogenèse (action directe sur les tubes séminifères),
- agit sur les voies séminales, développe la vésicule séminale et la prostate (par le système vasculaire),
- active le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires,
- stimule la fonction des glandes sébacées et sudoripares (acné),
- stimule la libido et la puissance sexuelle.

La **spermatogenèse** est sous rétro-contrôle négatif :

- Les hormones gonadotropes sécrétées par l'adénohypophyse stimulent les testicules :
 - FSH active la spermatogenèse et stimule la formation d'*Inhibitine* par les cellules de Sertoli,
 - LH stimule la synthèse de *testostérone* par les cellules de Leydig
- Un taux sanguin ascendant de testostérone inhibe la synthèse de gonadotropines par l'adénohypophyse

Ovogenèse

- Action de l'axe hypothalamo-hypophysaire sur l'ovaire,
- Action de l'ovaire sur la muqueuse utérine (nidation de l'œuf fécondé),
- Action de l'ovaire et de l'utérus sur l'axe hypothalamo-hypophysaire

Les organes cibles sont l'ovaire, l'endomètre et le col de l'utérus à l'accouchement (rôle de l'Ocytocine)

Le **cycle ovarien** est sous rétro-contrôle négatif :

- *Phase folliculaire* (œstrogénique) du 5 au 14^{ème} jour : mûrissement d'un follicule
- *Ovulation* au 15^{ème} jour : **pic de LH**
 - Stimulation de la production d'*œstrogènes*,
 - Déclenche l'ovulation,
 - Transforme le follicule vide en corps jaune,
 - Déclenche la production de *progestérone*.
- *Phase lutéinique* (progestative) du 15 au 28^{ème} jour
Le taux élevé de progestérone et d'œstrogènes inhibe la production de FSH et LH par l'hypophyse.