

Chapitre 9

Différenciation d'un type cellulaire : la cellule musculaire striée squelettique

Cours

PLAN DU CHAPITRE

- 1 La cellule musculaire striée squelettique : une cellule différenciée
- 2 Des somites aux myoblastes à l'origine de la musculature des membres
- 3 La myogenèse
- 4 Les cellules satellites : outils pour la régénération

ZOOM

- 1 La technique des chimères caillies-poulets
- 2 L'acquisition de la polarité dorso-ventrale des somites requiert des centres inducteurs
- 3 La famille des facteurs myogéniques

INTRODUCTION

Nous avons vu au chapitre 8 que lors du développement du bourgeon de membre des vertébrés, les cellules prolifèrent, se différencient et dans certains cas entrent en apoptose (mort cellulaire programmée). Le membre chiridien est constitué de nombreux tissus assurant en particulier le soutien et la mobilité de l'organisme. La formation de l'un d'entre eux, le tissu musculaire strié squelettique est un bon exemple pour illustrer les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques qui contrôlent la spécification, la détermination, puis la différenciation (myogenèse) d'un type de cellule : le myoblaste.

- **Quelles sont les caractéristiques d'une cellule différenciée, la cellule musculaire striée squelettique ?**
- **Comment certaines cellules mésodermiques pluripotentes forment-elles des cellules musculaires ?**
- **Quels sont les gènes dont les produits d'expression contrôlent la spécification, la détermination puis la différenciation des myoblastes ?**

1 La cellule musculaire striée squelettique : une cellule différenciée

Chez l'humain, les muscles striés squelettiques représentent environ 40 % de la masse corporelle adulte, un peu moins de 50 % chez le chien et 38 % chez la souris. Chez les vertébrés, la masse musculaire est donc variable et sa répartition dans le corps est dépendante des adaptations de l'animal à son milieu.

Les muscles sont constitués de **fibres musculaires** (cellules musculaires également appelées **myocytes** ou rhabdomyocytes), unités structurales et fonctionnelles de tous les muscles striés squelettiques dont les muscles des membres. Elles confèrent aux muscles cinq propriétés essentielles et uniques.

- La **contractilité** : c'est la propriété du tissu musculaire de se contracter avec force en présence d'une stimulation appropriée, et de mobiliser les éléments osseux auxquels ses fibres sont rattachées. Le muscle peut se contracter sans qu'il n'y ait de mouvement (contraction isométrique) ou bien se contracter avec apparition de mouvement (raccourcissement global du muscle).
- L'**élasticité** : aptitude du muscle à reprendre sa forme initiale quand la contraction cesse.
- L'**excitabilité** : propriété que possède une cellule à réagir à une stimulation par la production de signaux électriques.
- La **tonicité** : propriété du muscle à être dans un état permanent de tension, tonus musculaire.
- La **plasticité** : propriété du muscle à modifier sa structure selon le travail qu'il effectue et à s'adapter au type d'effort.

Ces propriétés font que les muscles striés squelettiques exercent quatre fonctions au sein de l'organisme : la mobilisation du corps dans son environnement, le maintien de la posture globale, la stabilité des articulations et la production de chaleur (thermorégulation). Selon leur fonction, leur structure et leur innervation, on distingue trois types de muscles : muscle viscéral lisse, muscle cardiaque, muscle strié squelettique qui fait l'objet de ce qui suit.

1.1 La fibre musculaire dans le muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique se compose d'une région active rouge et contractile, le corps charnu (ou le ventre), et d'extrémités résistantes permettant son attache aux os, les tendons (figure 9.1). Les tendons sont constitués de tissu conjonctif dont la matrice est riche en **laminine** et en **collagène** (collagène I), une protéine peu extensible. Ils sont souples mais très peu élastiques. Grâce à ces propriétés, les forces développées par la contraction musculaire sont intégralement appliquées aux os sur lesquels ils s'insèrent. Un tendon s'attache au muscle par la jonction myotendineuse et à l'os par la jonction ostéotendineuse. À la **jonction myotendineuse**, la membrane plasmique des myocytes forme des replis, des interdigitations qui augmentent la surface de contact avec le tendon. Cette membrane est particulièrement riche en **intégrines** qui participent à la formation de complexes d'ancrage entre le cytosquelette du myocyte et la laminine de la matrice extracellulaire du tendon.

Voir ouvrage de 1^{re} année, chapitre 9, figure 9.21

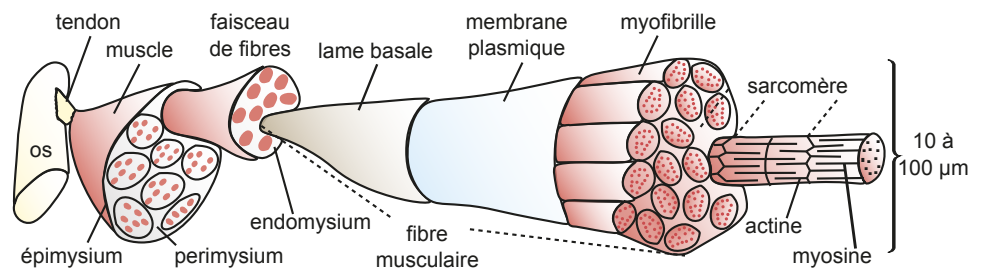


Figure 9.1 Le muscle strié squelettique et ses différents niveaux d'organisation.

Les noyaux, le réticulum, l'innervation et la vascularisation ne sont pas figurés. Les muscles sont irrigués par des réseaux capillaires très développés et innervés par des nerfs comprenant des motoneurones faisant des synapses avec les cellules musculaires et des fibres sensibles.

Voir chapitre 10, § 2.2 et chapitre 11, § 2.3b

Le muscle est entouré et structuré avec du tissu conjonctif fibreux qui permet de le soutenir et de protéger les fibres musculaires qui le composent. L'**épimysium** (ou aponévrose), très riche en fibres de collagène, disposées en plans superposés, forme une enveloppe individualisant chaque

Voir chapitre 10, § 1.1

muscle. Le **périnysium** cloisonne le muscle en faisceaux de fibres musculaires. Les cloisons du périnysium sont richement vascularisées et innervées. Enfin, les fibres musculaires d'un faisceau sont parallèles les unes aux autres et sont entourées par une lame basale et un réseau plus périphérique de fibres de réticuline (une protéine des matrices extracellulaires). L'ensemble constitue l'**endomysium** dans lequel s'insinuent les fibres et terminaisons nerveuses, ainsi que la microcirculation. Le muscle contient également des adipocytes qui se développent le long des faisceaux de fibres.

Le muscle est donc constitué de plusieurs faisceaux, un faisceau de plusieurs fibres musculaires, une fibre musculaire de plusieurs myofibrilles et une myofibrille de plusieurs myofilaments (protéines du cytosquelette).

1.2 La fibre musculaire : relations structure/fonction

La fibre musculaire striée squelettique est une cellule de grande taille qui peut atteindre 35 cm de long, pour un diamètre de 10 à 100 μm . Elle est cylindrique, allongée, striée, entourée par une lame basale, contient plusieurs myofibrilles représentant 80 % du volume de la cellule et possède plusieurs éléments caractéristiques (figure 9.2).

Voir chapitre 11, § 2.3

- Une membrane plasmique, le **sarcolemme** qui génère et propage des signaux électriques stéréotypés appelés **potentiels d'action**. Il présente des invaginations, les tubules T, qui pénètrent à l'intérieur de la fibre musculaire formant un réseau entourant les myofibrilles.
- Un cytoplasme, le **sarcoplasme**. Il contient plusieurs noyaux allongés (de 2 à 500) en périphérie du sarcoplasme et parallèlement au sarcolemme (**cellule plurinucléée**). Il contient également de la myoglobine (protéine constituant une réserve d'oxygène) et des grains de glycogène (réserve énergétique) dispersés dans le sarcoplasme.
- Des mitochondries très riches en enzymes respiratoires, les **sarcosomes** fournisseurs d'énergie sous forme d'ATP. Avec la myoglobine et le glycogène, elles assurent l'énergétique de la contraction.

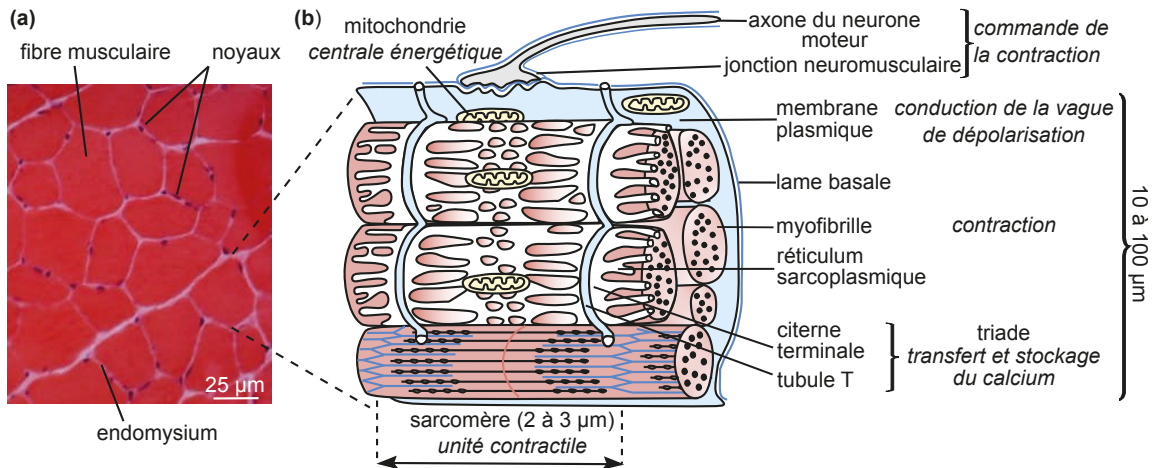
Voir ouvrage de 1^{re} année, chapitre 11, § 4

Figure 9.2 La fibre musculaire striée squelettique.

(a) Microscopie optique d'une coupe transversale de muscle strié squelettique de souris. Fibres musculaires en rouge. Leurs noyaux en bleu sont situés à la périphérie des cellules, plurinucléées. (Dr. Didier Montarras/Institut Pasteur/CNRS Photothèque. La figure a été réalisée dans le cadre de recherches menées par le laboratoire Bases génétiques, moléculaires et cellulaires du développement. Pour retrouver d'autres images des laboratoires du CNRS : <https://images.cnrs.fr>).

(b) Représentation schématique de la fibre musculaire. Les noyaux ne sont pas figurés.

- Le **réticulum sarcoplasmique lisse** forme un réseau de fins tubules longitudinaux entourant de ses mailles chaque myofibrille sur toute sa longueur, et dont les extrémités dilatées en citernes terminales établissent des contacts intimes avec les tubules T (figure 9.2 b). Associés aux citernes du sarcoplasme, il forme les **triades** qui assurent le transfert et le stockage du calcium intracellulaire et la transmission de l'information déclenchant la contraction, de la membrane au cytoplasme.
- Du **cytosquelette** : en microscopie photonique, la cellule présente une double striation longitudinale et transversale. Chaque myofibrille présente dans sa longueur une alternance régulière de bandes sombres et de bandes claires, d'où son apparence striée. Elle est constituée de plusieurs filaments de protéines contractiles : des filaments épais de **myosine**, des filaments fins d'**actine**. Le chevauchement de ces filaments forme les **sarcomères**, ce sont les plus petites unités contractiles du muscle strié squelettique (figure 9.2b).

1.3 Le sarcomère unité contractile de la myofibrille

Au microscope, le sarcomère apparaît strié avec une succession de bandes sombres A (anisotropes) et de bandes claires I (isotropes) (figure 9.3). Les sarcomères contiennent 2 types de filaments protéiques disposés parallèlement : les **myofilaments**. Les myofilaments épais (14 nm de diamètre), formés principalement de myosine, occupent la partie centrale du sarcomère correspondant à la bande sombre A. Les myofilaments fins (7 nm de diamètre), formés d'actine associée à d'autres protéines, en appui sur les stries Z, s'insinuent entre les filaments épais de la bande A. La bande I claire ne présente que des myofilaments fins alors que la bande H centrale ne comporte que des myofilaments épais.

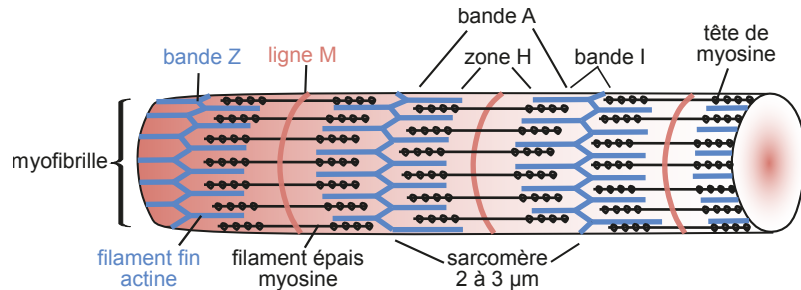


Figure 9.3 Représentation schématique des sarcomères d'une myofibrille.

La myofibrille est constituée d'unités structurales et fonctionnelles répétitives disposées bout à bout : les sarcomères. Chaque sarcomère est constitué de deux demi-bandes I appuyées sur les stries Z qui encadrent une bande A. La bande H occupe le milieu de la bande A ; elle est parcourue en son milieu par la ligne M qui correspond aux points d'ancrage des filaments épais de myosine.

a) La myosine : myofilaments épais

Ces myofilaments sont constitués d'environ 150 molécules de myosine (plus exactement l'isoforme appelée myosine II). La molécule de myosine II (510 kDa) est une protéine hexamérique constituée de 2 chaînes lourdes identiques et de quatre chaînes légères identiques deux à deux. Chaque chaîne lourde a la forme d'un club de golf : l'extrémité NH₂, de forme globulaire, est prolongée par une partie filamenteuse en hélice α de 150 nm de long (figure 9.4a). Chaque extrémité globulaire de chaîne lourde est associée par liaison non covalente à deux chaînes légères différentes ; l'ensemble forme une tête de myosine. Les deux chaînes lourdes sont associées en dimère par leurs parties filamenteuses ; enroulées l'une sur l'autre en spirale (surenroulement ou superenroulement), elles forment une queue de 150 nm. Au final, la molécule de myosine II apparaît constituée d'une queue et de deux têtes globulaires. Chaque myofilament épais de myosine est ancré sur la ligne M située

au milieu de la bande H. Il est fortement lié à des protéines élastiques, dont la titine. Ces protéines sont disposées en opposition et fonctionnent comme des ressorts moléculaires.

Les myofilaments épais sont des structures bipolaires (figure 9.4a) : les queues des molécules de myosine II y sont associées en faisceaux où elles sont disposées tête-bêche de sorte que les myofilaments épais sont dépourvus de têtes dans la région centrale alors que leurs deux extrémités exposent un nombre élevé de têtes. Il en résulte qu'à l'échelle du sarcomère, la bande H est dépourvue de têtes globulaires alors que dans le reste de la bande A les têtes de myosine sont nombreuses. Là, elles peuvent se lier aux myofilaments fins d'actine et constituer des ponts d'union entre les myofilaments fins et les myofilaments épais.

Le clivage enzymatique de la myosine II par la papaïne permet d'en isoler les têtes. Ces têtes présentent deux propriétés remarquables : elles sont capables de se lier aux filaments d'actine ; elles possèdent une activité ATPasique faible, mais cette activité ATPasique est multipliée 200 fois en présence d'actine.

Le clivage enzymatique de la myosine II par la trypsine en scinde la queue en deux fragments dont l'un porte les deux têtes globulaires. Ces sites de clivage enzymatique par la trypsine et la papaïne sont considérés comme des zones d'articulation ou de flexion moléculaire ; on parle de flexibilité structurale des têtes de myosine.

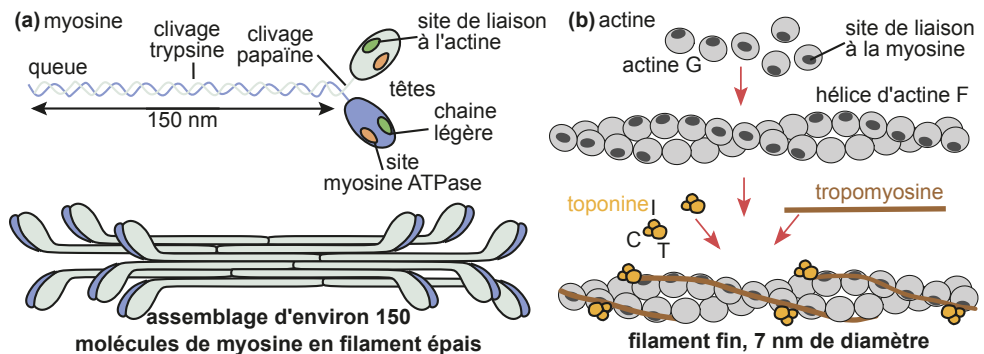


Figure 9.4 Représentation schématique des filaments épais (a) et fins (b).

b) Actine et protéines associées : myofilaments fins

Ces myofilaments de 7 nm de diamètre sont constitués d'actine associée à d'autres protéines. L'axe du myofilament fin est formé par l'association de deux molécules d'actine filamenteuse (actine F) disposées en hélice (figure 9.4b). L'actine F est formée par polymérisation d'actine globulaire ou actine G (42 kDa). Chaque myofilament fin comporte environ 350 molécules d'actine G et il y a 13 molécules d'actine G par tour d'hélice d'actine F.

Cette hélice d'actine F présente deux sillons ; dans chaque sillon est logée une autre protéine : la **tropomyosine** (32 kDa), molécule allongée qui s'étend dans le sillon de l'hélice d'actine F sur sept molécules d'actine G auxquelles elle est liée par liaison covalente. Dans le muscle au repos, la tropomyosine masque les sites de liaison des têtes de la myosine sur les filaments d'actine (figure 9.4b). Enfin, la **troponine** est une protéine globulaire (80 kDa) associée à la fois à l'hélice d'actine F et à la tropomyosine. Les molécules de troponine sont disposées de façon périodique sur le filament fin : une molécule de troponine par molécule de tropomyosine. La troponine résulte de l'auto-assemblage de trois sous-unités. La sous-unité T (ou TNT) interagit avec la tropomyosine et maintient le trimère de troponine plaqué contre la molécule de tropomyosine. La sous-unité I (ou TNI) sert d'intermédiaire en se liant à la fois aux sous-unités C et T. Au repos, à faibles concentrations en Ca^{2+} , la sous-unité I se lie aussi à l'actine et inhibe toute pos-

sibilité d'interaction de l'actine avec la myosine, potentialisant ainsi l'effet de masquage de la tropomyosine. La sous-unité C (ou TNC) peut fixer quatre ions calcium.

Les stries Z (ou bandes Z) sont constituées par deux types de protéines : l' α -actinine et la protéine Cap Z. Cap Z permet l'ancrage des filaments fins et évite à ce niveau leur dépolymérisation alors que l' α -actinine maintient leur disposition régulière. À l'autre extrémité, la dépolymérisation est empêchée par la tropomoduline. Enfin, la nébuline (non représentée sur la figure 9.5), protéine étirée et fixée tout au long du filament fin en détermine la longueur. Le filament fin du sarcomère est donc remarquablement stable.

1.4 Les mécanismes de la contraction

a) Raccourcissement des sarcomères par glissement réciproque des filaments

Durant la contraction, les filaments minces glissent le long des filaments épais, de telle sorte que les filaments d'actine et de myosine se chevauchent davantage dans le sarcomère. Au repos les filaments épais et minces ne se chevauchent que sur une petite partie de leurs longueurs, mais quand les cellules musculaires sont stimulées, les têtes de myosine s'accrochent aux sites de liaison de l'actine et le glissement s'amorce. Les têtes de myosine tirent les filaments fins vers le centre du sarcomère : c'est le **raccourcissement du sarcomère** (figure 9.5).

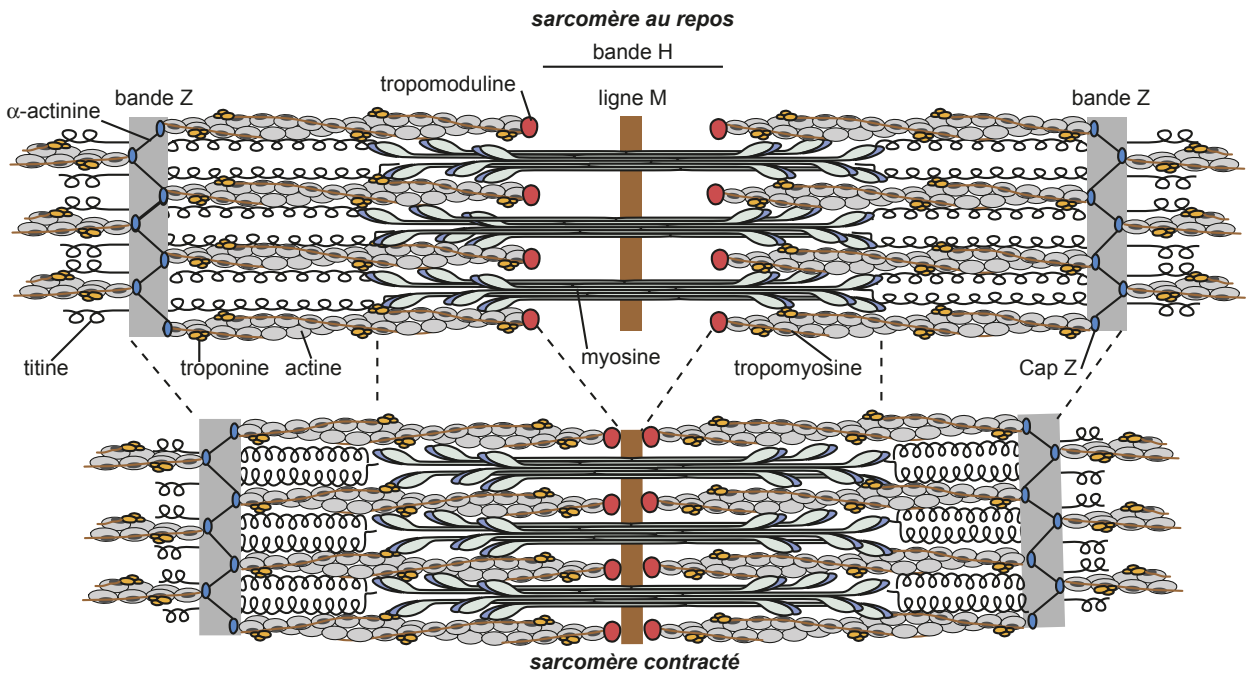


Figure 9.5 Représentation schématique du raccourcissement d'un sarcomère.

Les protéines α -actinine et Cap Z sont des composants de la bande Z. La tropomyosine s'étend le long des filaments d'actine jusqu'à la tropomoduline qui stabilise l'actine F en empêchant sa dépolymérisation en actine G. La titine fonctionne comme un ressort moléculaire en compression. Disposées par paires et en opposition, les molécules de titine permettent de maintenir les myofilaments épais à égale distance des bandes Z et participent au relâchement du sarcomère.

Dans un sarcomère contracté, la longueur des filaments d'actine et de myosine ne varie pas. La contraction s'opère par un glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine. Le raccourcissement cumulé de chacun des sarcomères aboutit à celui de toute la myofibrille.

La longueur des bandes A ne change pas durant le raccourcissement mais celle des bandes I et H diminue. Ainsi, le raccourcissement cumulé de chacun des sarcomères aboutit au raccourcissement général de la myofibrille et, à une échelle supérieure, au raccourcissement de la fibre et donc du muscle contenant cette fibre.

b) Contrôle de la contraction par le potentiel d'action

Au niveau de la jonction neuromusculaire, la transmission synaptique génère une dépolarisation locale de la membrane du myocyte, ou potentiel postsynaptique exciteur (PPSE). Il permet l'apparition du **potentiel d'action musculaire** qui se propage le long du sarcolemme et des tubules transverses (triades). Là, des canaux voltages-dépendants (les DHPR) sont localisés dans la membrane des tubules T. Ils sont en contiguïté avec des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique (les RyR). Lorsque le potentiel d'action parvient aux triades, les DHPR agissent comme des détecteurs d'intensité du voltage et subissent des changements conformationnels conduisant à une interaction moléculaire avec les RyR. Cela favorise leur ouverture et la libération du calcium stocké dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique, étape initiale de la contraction.

c) La contraction : couplage chimiomécanique entre les filaments fins et épais

Le **couplage** chimiomécanique de la contraction correspond à un couplage énergétique. Il implique ici une conversion d'énergie chimique (réaction exergonique, hydrolyse de l'ATP) en énergie mécanique (réaction endergonique, mouvement des têtes de myosine). Il se réalise selon la séquence suivante (figure 9.6).

- Une fois dans le milieu intracellulaire (sarcoplasme), quatre ions calcium se lient à la sous-unité C (TNC) de la troponine sur le myofilament fin d'actine.
- La troponine modifie sa structure tridimensionnelle, provoquant le déplacement latéral de la tropomyosine et donc le démasquage des sites de liaison à l'actine.
- Simultanément, la fixation du calcium sur la TNC permet la levée de l'inhibition exercée par la troponine I sur l'activité ATPasique de la tête de myosine. Cette activité ATPasique permet l'hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi, réaction Mg^{2+} dépendante.

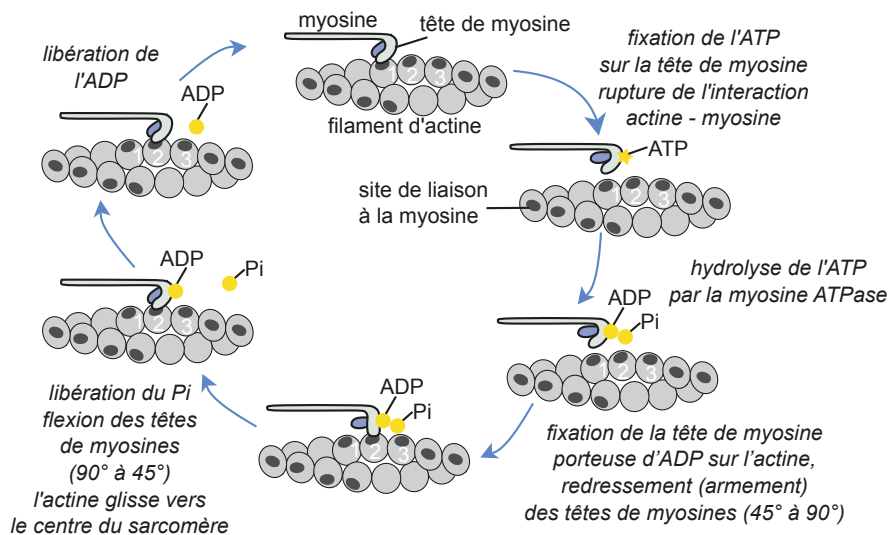


Figure 9.6 Interaction actine-myosine lors de la contraction du sarcomère : couplage chimiomécanique.

Le cycle de contraction illustré se déroule en présence de fortes concentrations cytosoliques d'ions calcium. L'activité ATPasique est une réaction Mg^{2+} dépendante.

- Dès que les sites de liaisons de l'actine sont démasqués, les têtes de myosine ayant hydrolysé l'ATP, se fixent immédiatement générant le complexe d'actomyosine.
- Le détachement du Pi puis de l'ADP des têtes de myosines, permet la flexion des têtes de myosines (modification de l'angle formé par les têtes de myosine fixées à l'actine). Il en résulte le **glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine**.
- La liaison de l'actine avec la myosine reste stable et seule la présence d'une nouvelle molécule d'ATP (qui se fixe sur la tête de myosine), permet sa rupture.
- La contraction se poursuit tant que le signal calcique et l'ATP sont présents.
- En l'absence de potentiel d'action, le réticulum sarcoplasmique récupère le calcium du sarcoplasme (transport actif). La troponine change de nouveau sa configuration et la tropomyosine masque les sites de liaison des têtes de myosine à l'actine. La contraction prend donc fin et les filaments reprennent leur position initiale, conduisant au relâchement du muscle.

Remarque

La rigidité cadavérique illustre bien le fait que c'est l'ATP qui permet le détachement des têtes de myosines et de l'actine. En effet, après la mort, la synthèse d'ATP prend fin. Le détachement des têtes de myosine devient impossible. L'actine et la myosine restent liées de façon irréversible, ce qui provoque la rigidité cadavérique, qui disparaît lorsque les protéines musculaires se dégradent en quelques heures.

1.5 La régénération de l'ATP

Lors de la contraction musculaire l'énergie servant à l'activité contractile (flexion, détachement des têtes de myosine et fonctionnement de la pompe calcique) est fournie par l'ATP. L'ATP est la seule source d'énergie qui peut alimenter directement la contraction. Or les stocks d'ATP immédiatement disponibles sont peu importants et ne permettent qu'une contraction en 4 à 6 secondes. La régénération continue de l'ATP permet à la contraction de se poursuivre. Elle se réalise en une fraction de seconde selon la séquence suivante.

- Interaction de l'ADP avec la **créatine phosphate** : au début de la contraction, une fois les faibles réserves d'ATP consommées, de l'ATP supplémentaire est ainsi rapidement reconstitué à partir d'une molécule à haute énergie :



Cette réaction est catalysée par la **créatine kinase**. La contraction peut ainsi être maintenue pendant 10 à 15 secondes.

- La **glycolyse** anaérobie suivie de la **fermentation lactique** : les réserves de glycogène du muscle sont transformées en acide lactique avec la production de deux molécules d'ATP. Ensemble, les réserves d'ATP et de créatine phosphate et la glycolyse anaérobie peut entretenir une activité musculaire pendant une minute.
- La **respiration cellulaire** aérobie : phosphorylation oxydative. Si l'activité musculaire est prolongée, l'ATP utilisé par les muscles est fourni par la respiration cellulaire aérobie qui se déroule dans les mitochondries. Elle nécessite la présence d'oxygène et fait intervenir une suite de réactions chimiques (cycle de Krebs, chaîne respiratoire et transport d'électrons). Pendant la respiration aérobie le glucose est entièrement dégradé. Ainsi, l'oxydation complète d'une molécule de glucose fournit 36 molécules d'ATP.

Contractile, élastique, excitable et plurinucléée, la cellule musculaire striée squelettique acquiert ces caractéristiques au cours du **développement** par différenciation de cellules souches issues des somites.

Voir ouvrage
de 1^{re} année,
chapitre 11, § 3

Voir ouvrage
de 1^{re} année,
chapitre 11, § 4

2

Des somites aux myoblastes à l'origine de la musculature des membres

Voir chapitre 7, § 4 et figures 7.12 et 7.13

Nous avons vu au chapitre 7 que le mésoderme paraxial se segmente en une série de paires de somites de part et d'autre du tube neural, dans une direction antéro-postérieure (figure 9.7a, b). Unités métamériques répétitives, les **somites** sont produits par la transformation en cellules épithéliales (épithélialisation) du mésoderme générant des structures embryonnaires transitoires, sphériques constituées d'un centre mésenchymateux, le somitocœle, recouvert par des cellules épithéliales (figures 9.7c et 9.8). Après leur épithélialisation, leur dissociation ou dé-épithélialisation est l'événement morphogénétique le plus notable concernant leur devenir (figure 9.8).

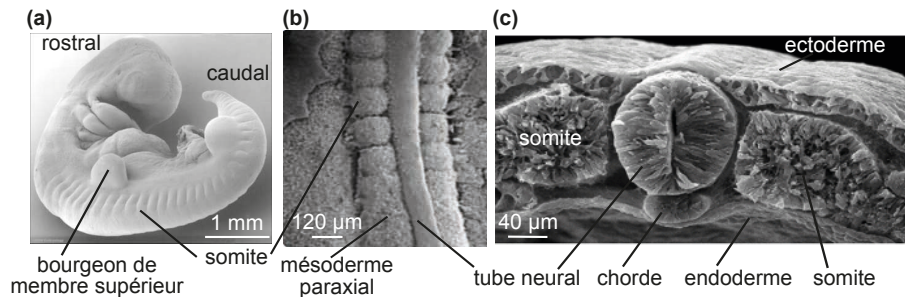


Figure 9.7 La formation des somites.

Vues en microscopie électronique à balayage.

(a) Embryon humain, 32 jours, 35 somites. Vue dorso-latérale droite, métamérie.

(b) Embryon de poulet. L'ectoderme est enlevé donnant accès à la région dorsale de l'embryon. (c) Embryon de poulet. Coupe transversale. Les somites nouvellement formés sont sphériques, limités par un épithélium issu du mésenchyme du mésoderme paraxial. Leur centre mésenchymateux forme le somitocœle.

(D'après, https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_stage_14).

! Attention !

Ne pas confondre la segmentation (clivage) qui se réalise après la fécondation et la segmentation (métamérie) du corps de l'embryon lors de l'organogenèse.

Voir ouvrage de 1^{re} année, chapitre 15, zoom 2

Voir chapitre 7, § 4 et figure 7.13

ZOOM 1

La technique des chimères caille-poulet

Voir ouvrage de 1^{re} année, TP 7, § 2

Voir chapitre 8, § 2

2.1 La dissociation des somites produit les progéniteurs musculaires

Après leur individualisation, les cellules de la région ventrale des somites sont soumises à une **transition épithélium-mésenchyme** qui donne naissance à des cellules isolées dans la matrice extracellulaire : le **sclérotome** (figure 9.8). Les études par hybridation *in situ*, immunomarquages et la réalisation de cartes des territoires présomptifs des somites construites par la technique des chimères caille-poulet, ont montré que la région dorsale des somites ou **dermomyotome** subit secondairement une dissociation en 3 régions distinctes.

- La région centrale du dermomyotome, le **dermatome** donne le derme de la peau.
- La région épaxiale, proche du tube neural, contient les cellules progénitrices des muscles striés squelettiques intercostaux et profonds du dos.
- La région hypaxiale, proche du mésoderme intermédiaire, contient les cellules progénitrices des muscles striés squelettiques de la paroi corporelle, muscles abdominaux et rotateurs du tronc. Certains progéniteurs de cette région s'isolent et migrent vers les bourgeons de membres donnant naissance aux muscles striés squelettiques extenseurs et fléchisseurs des membres. Ces progéniteurs sont spécifiés de façon progressive sous l'effet de facteurs paracrines codant une information de position et issus des territoires environnants.

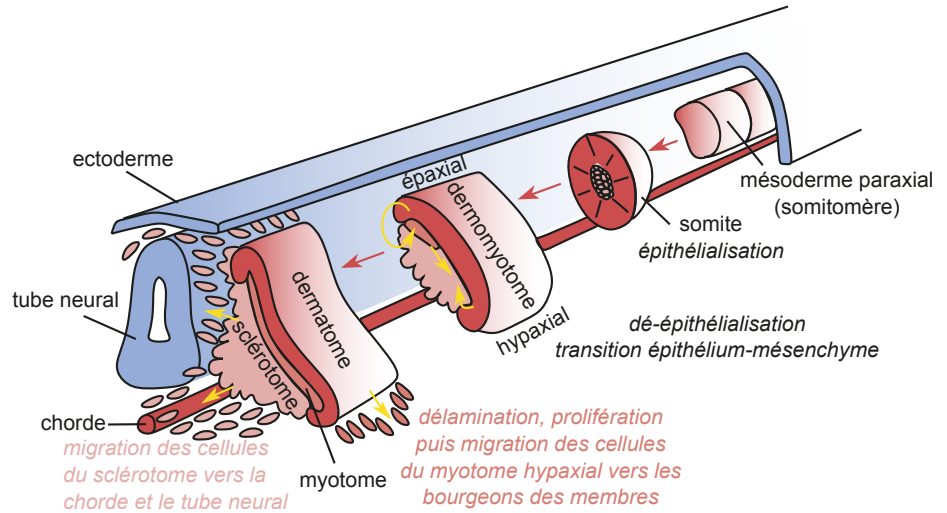


Figure 9.8 Les étapes de la dissociation des somites.

Le compartiment du sclérotome se forme lorsque les cellules de la région ventrale du somite sont converties en mésenchyme par la transition épithélium-mésenchyme. Dorsalement, le somite se différencie en dermomyotome subdivisé en dermomyotome central, épaxial et hypaxial. Le myotome se forme lorsque les cellules épithéliales de la lèvre dorsale du dermomyotome sont soumises à une transition épithélium-mésenchyme, prolifèrent et migrent entre le sclérotome et le dermomyotome (flèches jaunes). Les mêmes événements concernent la lèvre hypaxiale du dermomyotome. De plus à ce niveau, les cellules se délaminent, prolifèrent et migrent pour donner les progéniteurs myogéniques des membres. Les flèches rouges représentent la progression de la différenciation céphalo-caudale du mésoderme paraxial. La migration des cellules de la crête neurale et les ganglions ne sont pas figurés.

2.2 Facteurs paracrines et facteurs de transcription spécifient les myoblastes

Les cellules des somites nouvellement formés ne sont pas engagées dans un lignage myogénique spécifique. Les différents domaines somitiques sont progressivement spécifiés en réponse à des facteurs sécrétés par les tissus environnants : l'ectoderme dorsal, le tube neural, la chorde et le mésoderme latéral. Ils adressent une information de position dorso-ventrale aux cellules des somites, ce sont des **centres inducteurs**. Les protéines Wnt, BMP et Shh représentent les principaux facteurs paracrines à l'origine des voies de **signalisation** assurant l'induction des différents destins somitiques. Ces signalisations activent, de façon différentielle selon les territoires, la transcription des gènes *Pax* (gènes sélecteurs ou maîtres possédant une homéoboite). Ils codent des facteurs de transcription qui, dans les différents compartiments du dermomyotome, activent d'autres facteurs de transcription, les gènes myogéniques de la famille MyoD. Toutes les cellules produisant un facteur de transcription myogénique s'engagent alors dans une voie de différenciation myogénique. Ce qui, pour les cellules du myotome hypaxial, les conduit à se délaminer, à proliférer, migrer et générer des myoblastes à l'origine des muscles striés squelettiques des membres (figure 9.8).

! Attention !

Les gènes *Pax* possèdent une homéoboite (séquence nucléotidique qui code pour l'homéodomaine, motif protéique d'interaction avec l'ADN). Ce ne sont pas des gènes homéotiques car leurs mutations ne produisent pas d'homéoses, c'est-à-dire l'apparition d'un organe bien formé, mais à un mauvais emplacement dans le corps. Ce sont des gènes maîtres qui activent, en amont, la cascade d'expression des gènes responsables d'une différenciation.

ZOOM 2

L'acquisition de la polarité dorso-ventrale des somites requiert des centres inducteurs

Voir chapitre 8, zoom 1

ZOOM 3

La famille des facteurs myogéniques

2.3 Migration et prolifération des myoblastes à l'origine de la musculature des membres

Chez la souris, entre 30 à 100 myoblastes quittent le myotome épaxial. Ils expriment le gène *Pax-3* requis pour les spécifier en myoblastes précurseurs de la musculature des membres. En effet, dans le mutant du gène *Pax-3*, les myoblastes ne peuplent pas le bourgeon de membre et la musculature fait défaut.

Pendant la migration, leur prolifération est stimulée par le facteur de croissance des hépatocytes (HGF, *Hepatocyte growth factor*) produit par les cellules environnant la zone de formation du membre. Avant de migrer, les myoblastes expriment le récepteur spécifique de ce facteur de croissance (la protéine tyrosine kinase c-met). Les myoblastes en migration expriment également la molécule d'adhérence cellulaire N-cadhérine, qui est importante pour les répartir correctement dans le mésenchyme du bourgeon de membre. Les myoblastes suivent l'allongement proximo-distal du bourgeon de membre, mais ne se localisent pas dans le mésenchyme distal. En effet la signalisation BMP dans cette région bloque la prolifération des myoblastes et peut même provoquer leur entrée en apoptose.

Pendant leur migration, les myoblastes se regroupent en deux masses musculaires : l'une précurseur des muscles fléchisseurs et l'autre donnant naissance aux muscles extenseurs. On sait peu de choses sur les mécanismes qui guident cette division des masses musculaires. Si l'on retire les somites normalement associés aux bourgeons de membre et qu'ils sont remplacés par des somites thoraciques par exemple, la morphogenèse musculaire des membres est normale même si les précurseurs des fibres musculaires sont dérivés de sources anormales. Cela suggère que les myoblastes ne possèdent pas d'informations intrinsèques guidant leur morphogenèse. C'est donc le mésenchyme du bourgeon de membre qui détermine la morphologie des masses musculaire au fur et à mesure qu'ils prennent forme et qui détient l'information morphogénétique requise pour assurer la différenciation des myoblastes.

Voir chapitre 8,
zoom 1

3

La myogenèse

La myogenèse est le processus qui permet la **différenciation** des myoblastes en fibres musculaires squelettiques (cellules musculaires striées, voir § 1). Quelle que soit l'origine somitique des myoblastes et les muscles striés squelettiques à générer, la myogenèse s'opère selon la même séquence. Chez les mammifères, il y a deux vagues myogéniques qui sont découplées dans le temps (figure 9.9).

3.1 Les vagues de myogenèse

La première vague met en place les myotubes primaires. Lors de la seconde vague, les myoblastes se différencient en myotubes secondaires qui s'associent aux myotubes primaires pour aboutir à la formation des fibres musculaires. Au cours des deux vagues, la myogenèse se réalise selon la même séquence d'événements cellulaires et de contrôle par des gènes sélecteurs (ou maîtres) établissant une hiérarchie génique nécessaire à chaque étape. Les différentes étapes et leurs contrôles sont figurés dans la figure 9.9. Après la spécification des précurseurs somitiques puis leur détermination en myoblastes, les faits marquants de la myogenèse sont les suivants.

- Les **myoblastes** dont la prolifération a été stimulée par la signalisation FGF/HGF, arrêtent de se diviser par extinction de ces voies de signalisation.
- Les myoblastes sécrètent de la **fibronectine** dans la matrice extracellulaire, s'y fixent via une intégrine (récepteur membranaire de la fibronectine), puis migrent. Si cette adhérence est bloquée expérimentalement, aucune cellule musculaire se différencie. L'interaction intégrine-fibronectine est essentielle pour permettre aux myoblastes de poursuivre leur myogenèse.

ZOOM 2

L'acquisition de la polarité dorso-ventrale des somites requiert des centres inducteurs

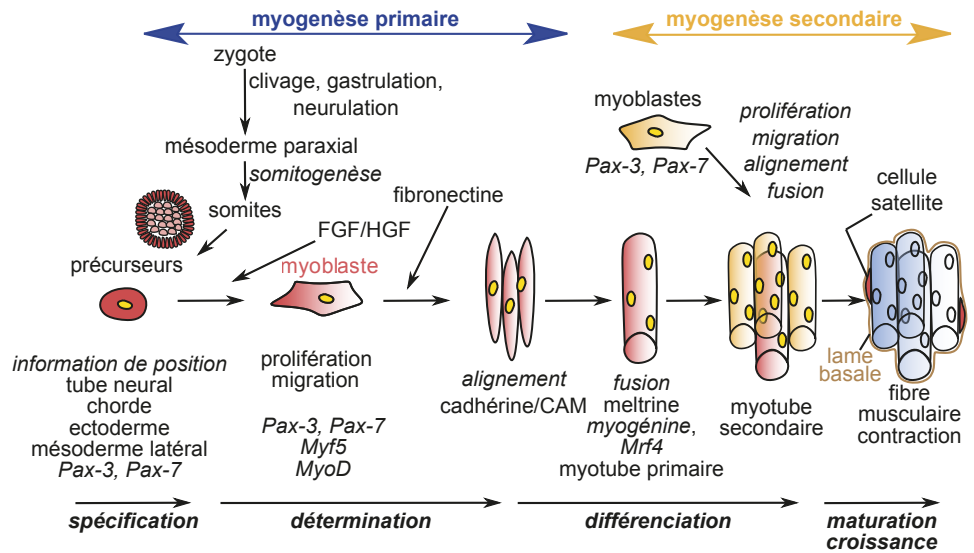


Figure 9.9 Les vagues myogéniques.

La première vague met en place les myotubes primaires, la seconde les myotubes secondaires. Après spécification, détermination, différenciation puis maturation et croissance, les fibres musculaires sont fonctionnelles.

- Les myoblastes des membres acquièrent une bipolarité, s'alignent parallèlement à l'axe proximo-distal du bourgeon de membre et adhèrent entre eux sous le contrôle d'une synthèse de glycoprotéines membranaires, dont les cadhérines et les **CAM**. Leur différenciation s'initie alors.
- Avant leur fusion, les myoblastes fusiformes engagent des modifications métaboliques : une augmentation du nombre de mitochondries, la production d'enzymes nécessaires à l'utilisation du glucose et du glycogène et le développement du réticulum sarcoplasmique.
- La fusion des myoblastes en **myotubes** est concomitante à la séparation des masses musculaires, précurseurs des muscles fléchisseurs ou extenseurs. Elle est marquée par l'expression d'une capacité de reconnaissance intercellulaire. Un myoblaste peut fusionner avec un myoblaste d'une autre espèce, mais pas avec un type cellulaire différent. La fusion requiert également un ensemble de protéines de fusion appelées **meltrines**. La fusion des myoblastes donne naissance aux myotubes, structures plurinucléées, destinées à devenir les fibres musculaires squelettiques.
- Après la fusion, les cellules plurinucléées formées commencent à synthétiser la myogénine et le facteur de régulation de la myogenèse (Mrf4), deux protéines myogéniques. Elles interagissent avec les régions régulatrices de plusieurs gènes cibles musculaires et activent leur expression. Alors que les protéines MyoD et Myf5 agissent pour l'étape de détermination, la myogénine et Mrf4 agissent sur la différenciation ultérieure des myotubes primaires.
- Enfin, les myotubes primaires sécrètent l'interleukine 4 (IL-4, une cytokine, glycoprotéine sécrétée, du système immunitaire qui joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation) et les myoblastes expriment le récepteur à leur surface. Cette voie de signalisation promeut la fusion de nouveaux myoblastes avec les myotubes. Ainsi, les myotubes recrutent les myoblastes et leurs fusions successives permettent la croissance des myotubes et la formation des fibres musculaires définitives.

La myogenèse primaire génère donc un premier ensemble de myotubes primaires qui servent d'échafaudage pour la myogenèse secondaire. Celle-ci est initiée par une population de progéniteurs myogéniques exprimant le gène *Pax7*, qui proviennent des somites. Ces progéniteurs

Voir ouvrage de 1^{re} année, chapitre 5, zoom 4

ZOOM 3

La famille des facteurs myogéniques

ZOOM 2

L'acquisition de la polarité dorso-ventrale des somites requiert des centres inducteurs



entrent en myogenèse en générant de nouveaux myotubes ou fusionnent à ceux existants selon la même séquence cellulaire et moléculaire que pour la myogenèse primaire. La myogenèse secondaire aboutit à l'établissement du patron définitif de la musculature post-natale et adulte des membres. Les phases ultérieures de la myogenèse impliquent les étapes de maturation et de croissance des myotubes.

3.2 Maturation et croissance des myotubes

La maturation des myotubes est caractérisée par :

- une augmentation de la synthèse des protéines contractiles telles que l'actine musculaire squelettique, les chaînes lourdes et légères de la myosine, les isoformes musculaires de la troponomyosine et de la troponine, la titine qui constituent les composants majeurs des sarcomères, unité contractile de la cellule musculaire (voir § 1.3) ;
- une augmentation de l'activité des enzymes telles que la créatine phosphokinase et la glycogène phosphorylase ;
- la synthèse des protéines de la jonction neuromusculaire : acétylcholinestérase et récepteur de l'acétylcholine (AChR).

La synthèse de toutes ces protéines et des protéines contractiles précède la formation des myofibrilles et l'apparition des premiers sarcomères. Des centaines de sarcomères s'assemblent ainsi en longues chaînes pour former les myofibrilles qui s'étendent progressivement vers les deux extrémités des fibres où elles s'ancrent à la jonction myotendineuse (entre le muscle et le tendon). Chaque cellule musculaire s'entoure d'une lame basale spécialisée. Le sarcolemme s'ancre à la lame basale par un complexe multi-protéique, qui relie le cytosquelette à la matrice extracellulaire assurant ainsi la stabilité structurale de la fibre musculaire.

La maturation des myotubes est aussi marquée par les mouvements des noyaux. Ils se réalisent en quatre étapes : la centration, le déploiement, la dispersion et le regroupement (figure 9.10).

La maturation des myotubes se caractérise également par l'accumulation dans le sarcoplasme, de réserves importantes de glycogène (« carburant ») et de myoglobine (fournisseur d'oxygène) et par la formation des tubules T et des citernes du réticulum sarcoplasmique (voir § 1.3).

Enfin, la myostatine, un membre de la famille des facteurs paracrines TGF (*Transforming growth factors*), est produite pendant la différenciation et chez l'adulte. Elle agit de manière **autocrine**. Les mutations induisant une perte de la fonction de la myostatine conduisent à une hypertrophie musculaire du fait d'un nombre excessif de fibres musculaires. Elle exerce donc un **rétrocontrôle négatif** sur la myogenèse ce qui permet de réguler le nombre de fibres musculaires lors du développement et chez l'adulte.

Chez les bovins et les ovins, la sélection de géniteurs porteurs de caractères intéressants a généré des mutations naturelles du gène de la myostatine conduisant au phénotype culard. Ce phénotype se manifeste par une hypertrophie de toute la musculature striée squelettique, confirmant naturellement le contrôle exercé par la myostatine sur la croissance des myotubes.

Chez l'humain, les premiers myotubes sont différenciés au cours de la 5^e semaine, et à la fin de la 8^e semaine, la majorité des myotubes sont différenciés en fibres musculaires, le patron musculaire des membres est établi. Toutefois, les muscles des membres, doivent subir une croissance considérable en longueur et en section transversale pour suivre la croissance des membres de l'embryon avant et après la naissance. Ainsi, la croissance des fibres musculaires et donc des muscles entraîne une augmentation de volume de chaque muscle d'environ 20 fois. Elle ne dépend pas d'une augmentation du nombre de fibres musculaires (environ 250 millions chez l'humain), mais d'une augmentation de leur diamètre et de leur longueur par synthèse, recrutement et alignement de nouvelles myofibrilles et par leur allongement par l'ajout de sarcomères, généralement aux extrémités des fibres musculaires.

Voir chapitre 11, § 1

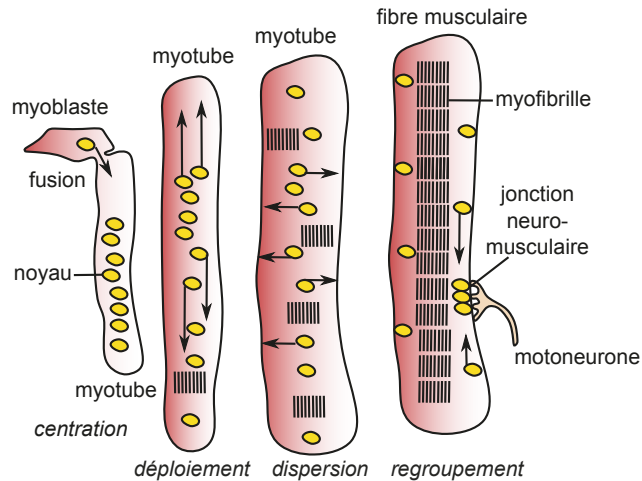


Figure 9.10 Les mouvements des noyaux pendant la maturation des myotubes.

Des microtubules issus de l'enveloppe des noyaux interagissent avec des moteurs moléculaires. La centration conduit le noyau du myoblaste vers le centre du myotube ($0,76 \mu\text{m}/\text{min}$). Elle est possible grâce à l'interaction avec la dynéine. Les noyaux se déploient ensuite tout au long du myotube ($0,2 \mu\text{m}/\text{min}$). Des ponts entre les microtubules se forment et la kinésine repousse les noyaux loin les uns des autres pour les répartir dans le myotube. La dispersion place les noyaux en périphérie de la fibre musculaire ($0,04 \mu\text{m}/\text{min}$). Les contractions des myofibrilles expulsent alors les noyaux vers la périphérie. Le regroupement positionne des noyaux sous la jonction neuromusculaire.

3.3 La différenciation terminale nécessite une innervation

En parallèle de leur maturation cytoplasmique et nucléaire, les myotubes sont innervés par les motoneurones ce qui assure leur différenciation terminale en fibres contractiles fonctionnelles. La myogenèse primaire semble être indépendante de l'innervation, car une dénervation précoce ne modifie pas le nombre de myotubes formés. En revanche, la myogenèse secondaire dépend de l'innervation puisque la dénervation inhibe la formation des myotubes secondaires.

La synthèse de l'AchR (récepteur de l'**acétylcholine**), déjà présente dans les myoblastes, est décuplée dans les myotubes. Les AchR sont initialement distribués uniformément à la surface du myotube, puis ils se rassemblent dans des zones spécifiques en relation avec les structures cytosquelettiques. Des terminaisons nerveuses convergent vers ces sites pour former des synapses. Une jonction neuromusculaire s'établit entre la terminaison axonale et les clusters de récepteurs. Au début, chaque fibre est innervée par au moins deux motoneurones, puis l'innervation multiple disparaît, de sorte que chaque fibre reçoit un seul motoneurone avec une sélection basée sur la compétition entre les axones. Lorsqu'un motoneurone est actif, il supprime les synapses des autres neurones. L'axone terminal se dilate et se recouvre d'une cellule de Schwann. Lorsque le myotube est innervé, la synthèse des protéines contractiles, des AchR et du système de régulation troponine-tropomyosine est accélérée. Ce n'est qu'alors que le myocyte est définitivement différencié et fonctionnel.

3.4 Les myocytes participent au contrôle de la formation des tendons

Les cellules des tendons, les ténocytes, proviennent de précurseurs issus du mésoderme latéral. Les myocytes ne sont pas nécessaires pour l'initiation de la formation des tendons, mais ils produisent le facteur de croissance transformant- β (TGF β), nécessaire pour la différenciation ultérieure des tendons, qui se traduit notamment par l'expression des gènes codant les collagènes.

4

Les cellules satellites : outils pour la régénération

ZOOM 2

L'acquisition de la polarité dorso-ventrale des somites requiert des centres inducteurs

Au cours de la vie de l'organisme, les muscles subissent plusieurs cycles de régénération parce qu'ils doivent s'allonger, se renforcer, ou bien se réparer à la suite d'une blessure, de la perte de fibres musculaires, ou d'exercices musculaires prolongés. Pour cela, un sous-ensemble de cellules exprimant le gène *Pax7* est mis en réserve lors de l'organogenèse pour former, chez l'adulte, les cellules satellites, cellules souches du muscle. Elles proviennent des somites, de la partie centrale du dermomyotome. Ces cellules quiescentes se distribuent entre la membrane plasmique des fibres musculaires et la lame basale, d'autres se situent à proximité des capillaires. Elles représentent les cellules satellites, cellules souches musculaires capables de régénérer les fibres endommagées chez l'adulte.

Les blessures musculaires ou l'exercice musculaire prolongé induisent les cellules satellites à entrer dans le cycle cellulaire. Cette transition est permise par une diminution de l'expression des gènes inhibiteurs du cycle cellulaire, et une augmentation de l'expression des gènes activateurs. La cellule se divise asymétriquement pour produire une nouvelle cellule souche, ce qui renouvelle le pool de cellules satellites, et une cellule qui s'engage dans la voie de différenciation myogénique en exprimant les facteurs de transcription de la famille MyoD. Il s'ensuit la cascade d'événements cellulaires et moléculaires décrits pour la myogenèse embryonnaire fournissant les myoblastes qui fusionnent avec les fibres musculaires à réparer ou qui génèrent de nouvelles fibres.

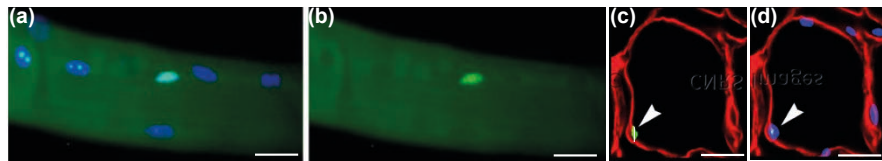


Figure 9.11 Mise en évidence de cellules satellites associées à une fibre musculaire.

(a-b) Microscopie à fluorescence, coupe longitudinale, anticorps dirigés contre la protéine Pax 7 caractéristique des cellules satellites. **(a)** La coloration bleue marque les noyaux de la fibre musculaire ; **(a et b)** la coloration verte révèle l'expression de la protéine Pax7 dans le noyau d'une cellule satellite.

(c-d) Microscopie à fluorescence, coupe transversale. **(c)** La coloration verte révèle l'expression de la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*), sous le contrôle du gène *Pax7*, dans le noyau d'une cellule satellite (tête de flèche). **(d)** La coloration bleue marque tous les noyaux en périphérie de la cellule. La coloration rouge, commune aux deux images, révèle la présence d'une protéine de la matrice extracellulaire, la laminine, à la périphérie de la fibre musculaire. La capacité de réparation d'un muscle repose sur un petit nombre de cellules satellites. À la suite d'une lésion, ces cellules s'activent, prolifèrent, génèrent des myoblastes qui fusionnent entre eux pour former de nouvelles fibres ou avec les fibres détruites pour les reconstruire. Échelles : 25 µm. (Dr. Didier Montarras/Institut Pasteur/CNRS Photothèque. Les figures ont été réalisées dans le cadre de recherches menées par le laboratoire Bases génétiques, moléculaires et cellulaires du développement. Pour retrouver d'autres images des laboratoires du CNRS : <https://images.cnrs.fr>).

Le vieillissement est associé à un déclin progressif de la masse musculaire, de la qualité et de la force musculaire, une condition connue sous le nom de sarcopénie. La sarcopénie est un syndrome gériatrique caractérisé par un vieillissement prématuré qui peut débuter aux environs de 30 ans, par une diminution de la masse musculaire, de la force musculaire et de l'endurance. Elle est également marquée par une augmentation des graisses intramusculaires et du tissu conjonctif (entre les fibres musculaires), et par une diminution de l'activité enzymatique des cellules musculaires. Mais surtout, elle est la conséquence de l'épuisement du pool de cellules satellites. Dans le muscle jeune, un équilibre critique entre l'engagement vers la myogenèse et l'auto-renouvellement des cellules satellites est maintenu. Les muscles âgés montrent une augmentation de l'étape d'engagement vers les progéniteurs myogéniques au détriment de l'auto-renouvellement, entraînant une

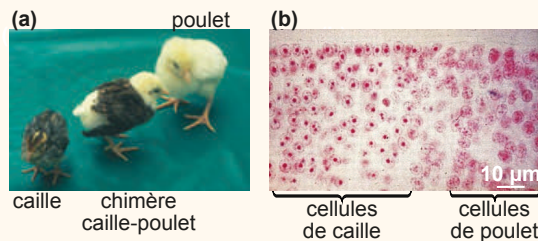
mauvaise régénération et un épuisement des cellules satellites de réserve. Les cellules satellites des muscles très âgés sont épuisées ou entrent en sénescence, perdent leur capacité à revenir vers le cycle cellulaire et à s'engager vers la différenciation myogénique.

ZOOM 1

La technique des chimères caille-poulet

La technique repose sur la différence de structure entre le noyau des cellules de caille et celui de poulet (figure ci-dessous). Le noyau des cellules de caille contient une masse d'**hétérochromatine** volumineuse, au centre du noyau et associée à l'ARN ribosomique, alors que le noyau des cellules de poulet contient de l'hétérochromatine dispersée dans le nucléoplasme. Les deux espèces sont voisines au plan taxonomique et les développements embryonnaires sont identiques. On peut donc réaliser des greffes en éliminant un territoire chez l'embryon de poulet et le remplacer par le même territoire prélevé chez un embryon de caille. Ainsi, l'association *in ovo* ou *in vitro* des tissus permet d'obtenir des chimères viables. Le marqueur génétique naturel que représente l'aspect caractéristique des noyaux, facile à visualiser sur des préparations microscopiques, permet un suivi permanent du devenir des cellules et de leur différenciation dans le tissu ou l'organe chimère. L'avantage de ce marqueur génétique, par rapport à d'autres est sa parfaite stabilité quelle qu'ait été la durée du développement de l'individu chimère et le type cellulaire dans lequel les cellules greffées se sont différenciées.

Voir chapitre 7, zoom 3 et TP5, figure TP5.8



Chimère caille/poulet.

(a) Chimère caille-poulet obtenue après une greffe d'une portion du tube neural de caille sur un embryon de poulet. **(b)** Coupe histologique réalisée après une greffe caille-poulet. Les cellules de caille ont une volumineuse masse d'hétérochromatine nucléaire, alors que celles de poulet ont une hétérochromatine dispersée dans le noyau. (Institut d'Embryologie/CNRS Photothèque. Cette photographie a été réalisée dans le cadre de recherches menées par la Pr. Nicole Le Douarin, médaille d'or du CNRS en 1986. Pour retrouver d'autres images des laboratoires du CNRS : <https://images.cnrs.fr/>).

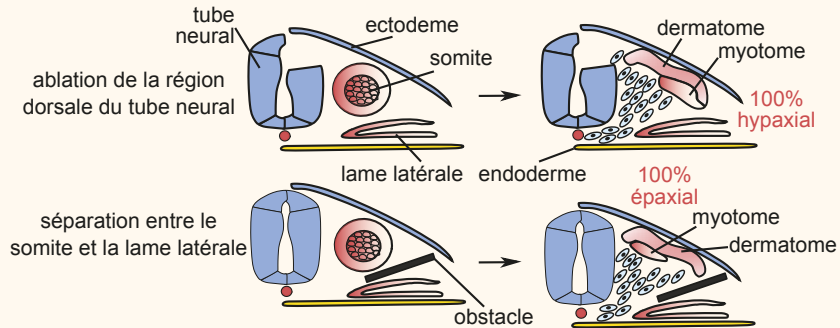
ZOOM 2

L'acquisition de la polarité dorso-ventrale des somites requiert des centres inducteurs

Au cours de la somitogenèse, les somites puis les myotomes acquièrent une polarité dorso-ventrale. Elle est mise en place par des **signalisations** issues des territoires environnants. Chez le poulet, une ablation du tube neural et de la corde au stade du somite épithélial entraîne la dégénérescence du somite. La greffe d'une corde entre le tube neural et le mésoderme paraxial non segmenté conduit à la disparition des dermomyotomes du côté où la corde est implantée au profit du sclérotome. Du côté de la greffe, la différenciation des muscles squelettiques et du derme est remplacée par la formation d'une masse de cellules cartilagineuses. Le même phénotype est obtenu lorsque l'on greffe le plancher du tube neural.

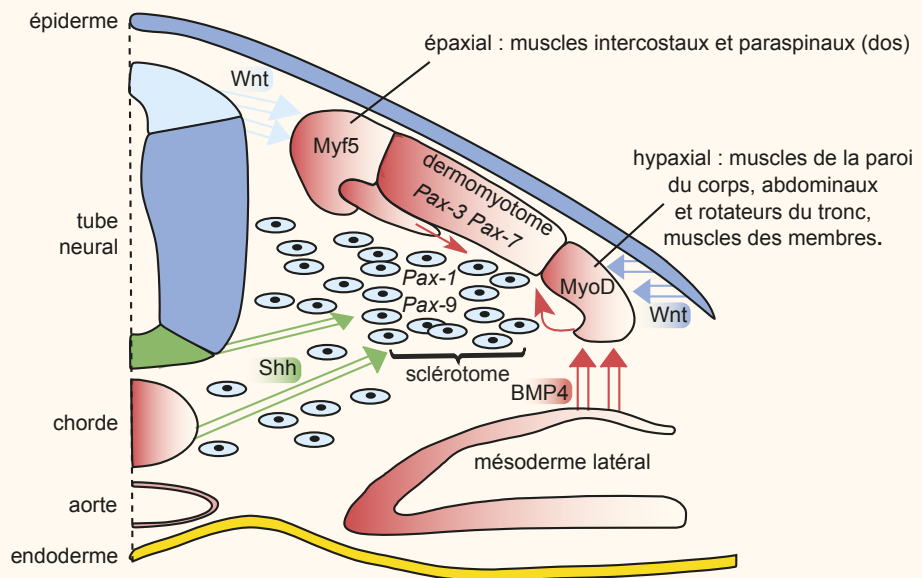
Une barrière interposée entre l'ectoderme dorsal et le somite empêche la formation du dermomyotome. Une ablation de la partie dorsale du tube neural (figure ci-dessous) empêche la formation du myotome épaxial. Une barrière interposée entre le somite épithélial et le mésoderme intermédiaire empêche la formation du dermomyotome hypaxial (figure ci-dessous).

Le tube neural, la corde l'ectoderme, le mésoderme intermédiaire sont donc indispensables pour donner une information dorso-ventrale au somite, ce qui permet de spécifier le sclérotome, le dermomyotome puis le myotome. Ce sont des **centres organisateurs** (inducteurs).



Analyse expérimentale de l'acquisition de la polarité dorso-ventrale des somites.

Chez tous les vertébrés, la corde et le plancher du tube neural sécrètent la protéine Sonic-hedgehog (Shh), l'ectoderme la protéine Wnt et le mésoderme latéral la protéine BMP. Ce sont des **facteurs paracrines** qui diffusent dans les espaces intercellulaires. Ils contribuent donc à donner une information de position aux somites. Les expériences ci-dessus et des invalidations des gènes codant ces protéines chez la souris (souris knock-out) ont permis de proposer un modèle où plusieurs signalisations et expressions différentielles de facteurs de transcription confèrent une identité aux régions épaxiale et hypaxiale du dermomyotome (figure ci-dessous).



Les signalisations et les facteurs qui contrôlent le développement des somites.

Voir chapitre 8, zoom 1

Voir ouvrage de 1^{re} année, TP 10, § 3.3 et chapitre 15, zoom 4

Les signalisations Wnt issues du toit du tube neural (flèches bleu clair) et de l'ectoderme (flèches bleu foncé) sont requises pour générer le dermomyotome, tandis que la signalisation BMP4 produite par le mésoderme latéral inhibe de manière transitoire l'identité des lignages somitiques. Ventralement, Shh sécrétée par la corde et le plancher du tube neural (flèches vertes) joue un rôle majeur dans l'induction du sclérotome. Ces signalisations activent la transcription des gènes maîtres *Pax*, dans les différents compartiments.

L'expression des gènes *Pax-1* et *Pax-9* est requise pour engager les cellules dans la voie de différenciation des vertèbres et des côtes.

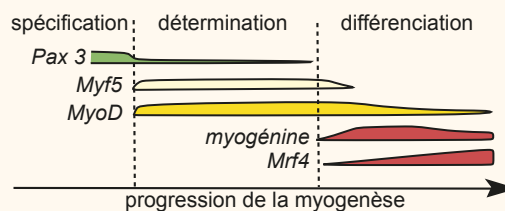
La région centrale du dermomyotome exprime les gènes *Pax-3* et *Pax-7* dont dépend le démarrage du programme myogénique. Le gène *Pax3* est d'abord exprimé dans le mésoderme paraxial quand les somites se forment, puis est progressivement restreint, d'abord au dermomyotome central et plus tard aux régions épaxiale et hypaxiale. Dans la région hypaxiale, la protéine Pax-3 active l'expression du gène *MyoD* ce qui détermine les cellules à s'engager, entre autres, dans la formation des fibres musculaires striées squelettiques des muscles des membres.

ZOOM 3

La famille des facteurs myogéniques

Les protéines MyoD, Myf5, Mrf4 et myogénine appartiennent à une famille de facteurs de transcription appelés les facteurs myogéniques bHLH (hélice-boucle-hélice basique), parfois aussi appelé la famille MyoD. Cette famille de protéines est au centre des mécanismes moléculaires de la détermination et de la différenciation myogénique. En effet, leur absence chez l'embryon de souris entraîne la mort à la naissance due à l'absence totale des muscles striés squelettiques. MyoD et Myf5, sont nécessaires pour la détermination en myoblastes des précurseurs somitiques. Dans la majorité des progéniteurs somitiques, le gène *MyoD* est transcrit sous le contrôle de la protéine Pax3. MyoD active directement la transcription de son propre gène (rétrocontrôle positif) assurant ainsi le maintien de sa transcription dans les myoblastes pendant leur détermination puis leur différenciation.

La myogénine et le facteur de régulation de la myogénèse (Mrf4) s'expriment en aval des gènes *MyoD* et *Myf5* et contrôlent la différenciation en activant la transcription des gènes codant pour les protéines assurant la fusion des myoblastes puis leur différenciation en myotubes. La myogénèse se réalise donc sous le contrôle d'une hiérarchie génétique d'expression des facteurs myogéniques (figure ci-dessous).



Hiérarchie d'expression des gènes codant les facteurs de transcription qui contrôlent la progression de la myogénèse.

Pax-3 est un gène régulateur maître de la spécification des progéniteurs musculaires dans les somites. Les produits d'expression des gènes *Myf5* et *MyoD* orchestrent la détermination des myoblastes. L'expression des gènes de différenciation, requise pour la fusion des myoblastes et la formation de myotubes, est contrôlée à la fois par la myogénine et par Mrf4.

DÉCOUVERTE 1

Les maladies congénitales de la fibre musculaire

On nomme myopathies un ensemble de maladies qui se manifestent par une diminution de la force développée par le muscle, quelle qu'en soit la cause. On en connaît une cinquantaine. Certaines touchent le métabolisme du myocyte (chaîne respiratoire, catabolisme du glycogène et du glucose) et donc la production d'ATP. D'autres affectent le sarcolemme comme la myopathie de Duchenne. Cette myopathie aussi appelée dystrophie est caractérisée par une extrême fragilité de la membrane de toutes les fibres musculaires (myocytes, cardiomyocytes et fibres musculaires lisses) : elles ne résistent pas aux tensions mêmes faibles développées lors de la contraction. Les fibres, ainsi que les cellules souches dont le sarcolemme s'est rompu, dégèrent. Cette maladie génétique est due à une mutation de la dystrophine, protéine située sous le sarcolemme qui participe au complexe protéique d'ancrage des myofibrilles au sarcolemme et à la matrice extracellulaire. À la naissance, l'enfant présente une musculature d'aspect normal mais celle-ci fond progressivement, en particulier au niveau des membres. En fait, toute la musculature est touchée avec comme conséquences une paralysie des membres, des insuffisances respiratoire et cardiaque et une issue souvent fatale.

Réviser

Résumé

La différenciation des cellules requiert des processus de contrôle du développement impliquant le fonctionnement hiérarchisé des gènes du développement. Possédant toutes un génome identique, les cellules n'en expriment qu'une partie ce qui définit leur identité. Ce mécanisme de sélection des gènes est la résultante de nombreux niveaux de contrôle de l'expression génique. L'un des processus majeurs du contrôle est assuré par les facteurs de transcription. Ainsi, la différenciation des somites, organes embryonnaires transitoires, repose sur l'expression des gènes sélecteurs (ou maîtres) : gènes *Pax* en synergie avec les inductions issues des tissus environnants. Au cours de l'organogenèse, une information de position précise ainsi la localisation définitive des tissus dans l'embryon, par rapport aux axes antéro-postérieur (gènes *Hox*) et dorso-ventral (gènes *Pax*). Les cellules somitiques du sclérotome expriment les gènes sélecteurs *Pax-1* et *9*. Les cellules somitiques du territoire dorsal sont à l'origine du dermomyotome (derme du tronc, muscles). Les cellules expriment les gènes *Pax-3* et *7* et s'engagent alors dans les voies de différenciation conduisant à la formation du derme ou des muscles. Des régulateurs transcriptionnels de la myogenèse de la famille MyoD séquentiellement exprimés dans les différentes populations cellulaires myogéniques, orchestrent deux vagues de détermination puis de différenciation musculaire c'est-à-dire l'expression de protéines dont l'organisation en myofilaments assure la contractilité des fibres musculaires. La différenciation est suivie d'une phase de maturation et de croissance, processus continu qui résulte d'une augmentation du diamètre et de la longueur des fibres (hypertrophie) sous le contrôle de la myostatine, facteur paracrine. Enfin, une population de cellules, les cellules satellites (population de cellules souches adultes) sont mises en réserve entre la lame basale et la membrane des fibres. Elles sont quiescentes et recrutables pour assurer la réparation des fibres musculaire lors de lésions.

Les contrôles du développement et de la différenciation sont donc progressifs et hiérarchisés de la fécondation à la différenciation terminale des cellules dans les tissus et les organes. Chaque étape est contrôlée par des synergies d'actions sous-tendues par des inductions et la transcription sélective des gènes du développement. Ces actions peuvent activer ou réprimer la transcription d'une cascade de gènes différents, ce qui explique qu'un même génome issu du zygote puisse servir à produire un grand nombre de types cellulaires différents dans les tissus et les organes.

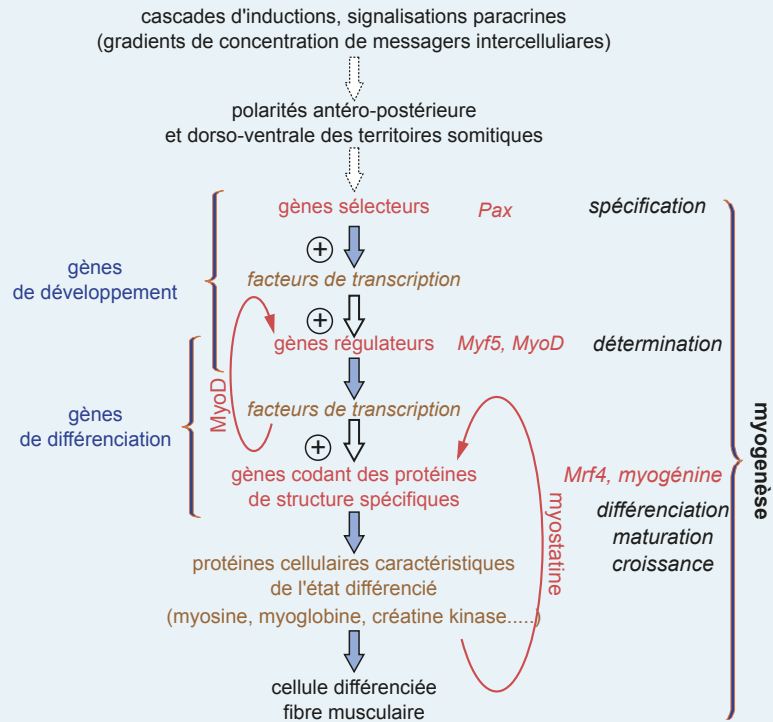


Figure de synthèse

Attention

- Sachez distinguer les facteurs paracrines et les facteurs de transcription.
- La myogenèse squelettique est un processus hautement ordonné dans lequel il convient de faire la distinction entre l'expression des gènes myogéniques, l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation phénotypique.

S'entraîner

QCM de connaissances

- 1 À propos de la myosine...
 - a. On trouve sur la myosine deux sites : un site de liaison avec l'actine et un site ATPasique pour hydrolyser l'ATP.
 - b. C'est un messenger paracrine.
 - c. L'agencement de nombreuses molécules multiplie le nombre de sites de liaison et d'hydrolyse au sein d'un filament épais.
 - d. Elle est constituée de 6 chaînes : 2 lourdes et 2 paires de chaînes légères.
 - e. Elle est en contact étroit avec la membrane plasmique de la cellule musculaire.
- 2 À propos de la contraction musculaire...
 - a. Quand le calcium se lie à la troponine, il y a déplacement de la tropomyosine et libération des sites de liaison à la myosine.
 - b. Avant de se lier à l'actine, les têtes de myosine doivent lier l'ATP et l'hydrolyser pour se charger en énergie.
 - c. Quand la myosine lie l'actine, il se produit une libération d'énergie et un pivotement de l'actine.
 - d. La contraction s'arrête par diffusion du calcium vers le milieu extracellulaire.
 - e. Lors de la contraction, la créatine kinase transfère le phosphate de la phosphocréatine pour produire de l'ATP à partir de l'ADP.
- 3 À propos des somites...
 - a. Ce sont des structures embryonnaires transitoires.
 - b. Ils marquent la métamérie de l'embryon de vertébré.
 - c. La région épaxiale des somites est à l'origine des muscles des membres.
 - d. Ils contiennent les progéniteurs de tous les muscles striés squelettiques.
 - e. Ils dérivent du mésoderme paraxial mis en place lors de la gastrulation.
- 4 À propos de la myogenèse des cellules musculaires striées squelettiques des membres...
 - a. Elle génère, en deux vagues, les myotubes des membres.
 - b. Elle requiert l'activation des gènes myogéniques codant les protéines Pax.
 - c. Elle s'initie à partir de progéniteurs somitiques spécifiés par le facteur de transcription Pax-3.
 - d. Elle requiert la migration des progéniteurs myogéniques présents dans le sclérotome.
 - e. Elle est sous le contrôle d'une hiérarchie d'expression de gènes codant des facteurs de transcription.

Question de synthèse courte

Développement embryonnaire et mise en place de cellules différenciées.

Sujet sur documents (analyse et mise en relation)

Les résultats d'expériences d'immunolocalisation de la protéine Pax-3 et d'hybridations *in situ* Pax-3 et *Myf5* sont présentés [figure 9.12](#).

(a) : représentation schématique d'une coupe transversale au niveau des bourgeons de membre chez la souris, observée en microscopie à épifluorescence après immunodétection de la protéine Pax-3 (figurée en vert).

(b) et (c) : schémas d'embryons de poulet en vues latérales gauches. Hybridations *in situ* avec une sonde nucléotidique *Pax-3*. (b) Embryon témoin. (c) Embryon présentant une mutation du gène *Pax-3* (embryon hétérozygote avec un allèle muté et un allèle sauvage). Les sites d'hybridation sont figurés en bleu.

(d) et (e) : schémas d'embryons en vues dorsales au niveau des bourgeons des membres supérieurs chez la souris. Hybridations *in situ* avec une sonde nucléotidique *Pax-3*. (d) Embryon témoin. (e) Embryon présentant une mutation hétérozygote pour le gène *Pax-3* (un allèle muté et un allèle sauvage). Les sites d'hybridation sont figurés en bleu.

(f) et (g) : schémas d'embryons de souris en vues latérales droites. Hybridations *in situ* avec une sonde nucléotidique *Myf5*. (f) Embryon témoin. (g) Embryon présentant une mutation conditionnelle du gène *Pax-3*. Les sites d'hybridation sont figurés en bleu. (D'après Bajard *et al.*, 2006. Genes Dev. 20, 2450-2464).

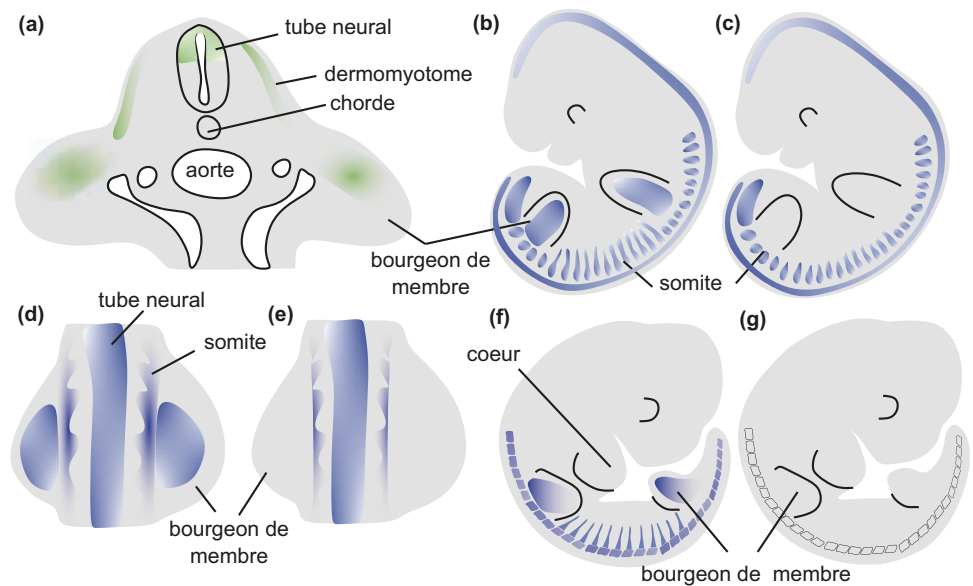


Figure 9.12 Analyse de la distribution et de la fonction des produits d'expression des gènes *Pax* et *Myf5*.

- 1 Donnez le principe de l'immunofluorescence et de l'hybridation *in situ*.
- 2 À partir des résultats présentés, déterminez la distribution de la protéine Pax-3 et des ARNm *Pax-3* et *Myf5*.
- 3 Interprétez les résultats des expériences présentées.
- 4 Quelle hiérarchie génique ces expériences permettent-elles de proposer pour la différenciation des cellules musculaires striées squelettiques des membres ?

Le développement d'un embryon de vertébré

Activités pratiques

PLAN DU CHAPITRE

- 1 Analyser les étapes du développement d'un embryon
- 2 Exploiter des données de marquage des cellules
- 3 Étudier un mouvement de la gastrulation : l'épibolie

INTRODUCTION

L'utilisation de préparations histologiques, de documents photographiques permettra d'analyser et de caractériser les étapes du développement d'un amphibien représentatif du développement des vertébrés.

- Quelles sont les étapes du développement, leurs caractéristiques et les événements cellulaires mis en jeu ?
- Quel est l'apport des techniques de marquage cellulaire à la compréhension du déroulement du développement embryonnaire ?

1 Analyser les étapes du développement d'un embryon

Le développement d'un embryon comprend une succession d'étapes au cours desquelles le zygote, cellule unique et totipotente, se multiplie et s'organise pour donner un organisme formé de deux puis de trois feuillets embryonnaires. Voici quelques points d'attention pour étudier les étapes du développement d'un embryon et définir ses caractéristiques.

- Lorsque ce n'est pas précisé, tenir compte de l'outil qui permet l'observation (microscopie électronique, optique, à épifluorescence) et de l'échelle, pour établir la taille de l'objet.
- Déterminer s'il s'agit de l'observation d'un embryon entier ou d'une région de l'embryon ou encore d'une coupe histologique.
- Orienter l'embryon, identifier le plan de coupe.
- Déterminer l'étape du développement et ses caractéristiques :
 - segmentation : embryon sphérique, type de segmentation (partielle, totale, égale, inégale), taille des cellules, présence ou non d'une cavité ;
 - gastrulation : grand nombre de cellules, encoches blastoporales, changement de forme et déplacement des cellules, différents feuillets embryonnaires, cavités ;
 - neurulation : apparition d'un tube en région dorsale ; modification de la forme de l'embryon, des tissus ou feuillets ;
 - organogenèse : embryon non sphérique, en cours d'élongation, croissance des tissus, apparition d'ébauches diverses permettant d'identifier les tissus ou organes en formation.

Cette première partie du TP propose sept séries de photographies permettant d'étudier les différentes étapes du développement et de définir leurs caractéristiques chez les amphibiens.

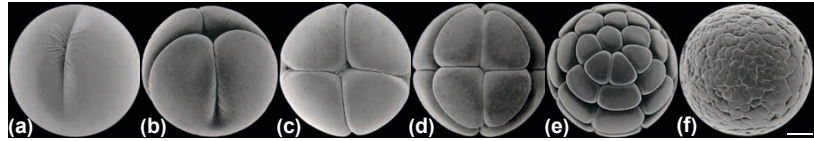


Figure TP5.1 Microscopie électronique à balayage.

Les enveloppes entourant le zygote ont été enlevées. Échelle 200 μm .
(Reproduit avec l'aimable autorisation du Dr. C. Aimar, Biologie et Multimédia, Sorbonne Université).

Figure TP5.1, toutes les photographies sont présentées à la même échelle ; à tous les stades, l'embryon est sphérique (1 mm de diamètre). Il s'agit du début de la **segmentation**. Toutes les vues sont prises depuis le pôle animal identifiable car c'est là que s'initie le premier sillon de division (a) et qu'à partir du stade présenté en (d) les blastomères y sont plus petits (micromères).

(a) Premier sillon de division, méridien (radiaire) ; divise le zygote en deux cellules de même volume.

(b-c) Deuxième sillon de division, méridien et perpendiculaire au premier ; quatre cellules de même taille.

(d) Troisième plan de division au-dessus de l'équateur (dans le plan de la micrographie) ; 4 micromères, 4 macromères ; segmentation totale et inégale.

(e) Blastomères de l'hémisphère animal et de l'hémisphère végétatif bien visibles ; leur taille diffère ; stade morula.

(f) Cellules à peine distinguables ; stade blastula ; la cavité, le blastocœle n'est pas observable puisqu'il s'agit d'une vue externe.

La segmentation se fait à volume constant de l'embryon : les blastomères deviennent donc de plus en plus petits. La segmentation de ce zygote hétérolécithe est totale, initialement égale et devient inégale.

Voir chapitre 7, § 2.1

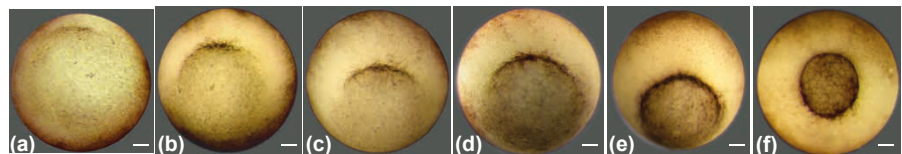


Figure TP5.2 Microscopie photonique.

Les enveloppes entourant le zygote ont été enlevées. Échelles : 110 μm .
(Reproduit avec l'aimable autorisation du Dr. M. Delarue, Biologie et Multimédia, Sorbonne Université).

Figure TP5.2, la séquence montre différents stades de la gastrulation puisque ces vues du pôle végétatif non pigmenté laissent apparaître le blastopore et son évolution. La gastrula a un volume constant et un diamètre de 1 mm.

(a-b) Initiation de la gastrulation. Une dépression est visible : l'encoche du blastopore dans l'hémisphère végétatif. Elle est limitée dorsalement par la lèvre dorsale du blastopore.

(c-f) Apparition des lèvres latérales (c-d) puis de la lèvre ventrale du blastopore (e-f). Elles entourent progressivement les cellules de l'hémisphère végétatif.

(f) Bouchon vitellin. Le blastopore est circulaire, sous équatorial et limité par ses différentes lèvres. On distingue les limites cellulaires des macromères de l'hémisphère végétatif, ce qui n'est pas le cas des micromères.

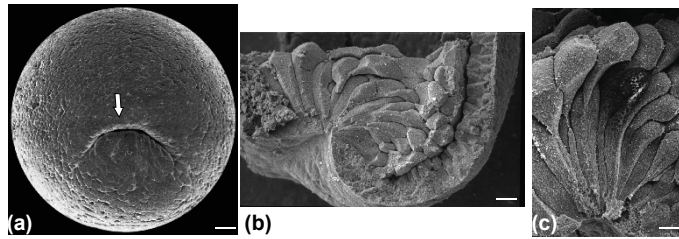


Figure TP5.3 Microscopie électronique à balayage.

Les enveloppes entourant le zygote ont été enlevées. **(a)** La flèche blanche indique le plan de coupe correspondant aux figures **(b)** et **(c)**. **(a)** Échelle : 100 μm . **(b)** Échelle : 10 μm . **(c)** Échelle : 5 μm . (Reproduit avec l'aimable autorisation du Dr. D. Shi, Sorbonne université).

Voir chapitre 7, § 3

Figure TP5.3 (a) Gastrula ; vue dorso-végétative. Début de gastrulation car l'encoche du blastopore, sa lèvre dorsale et le début des lèvres latérales sont bien visibles.

(b) Fragment de l'embryon dans la région de l'encoche du blastopore. Dépression marquant le blastopore ; cellules en forme de bouteille, étirées vers l'intérieur de l'embryon ; longueur proche de 40 μm , alors qu'une cellule endodermique voisine présente un diamètre de 10 μm .

(c) À plus fort grossissement, on distingue la forme caractéristique des cellules qui initient le mouvement d'involution lors de la gastrulation.

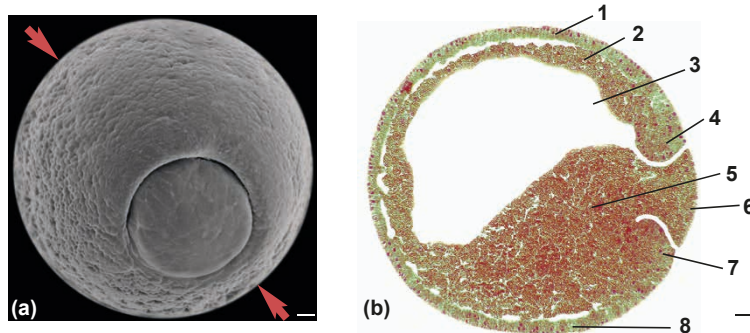


Figure TP5.4 Microscopie électronique à balayage et photonique.

(a) Microscopie électronique à balayage. Les flèches rouges indiquent le plan de coupe de la figure **(b)**. **(b)** Coupe histologique, microscopie photonique. Les enveloppes entourant le zygote ont été enlevées. Échelles : 50 μm . (Reproduit avec l'aimable autorisation des Drs. C. Aimar et M. Delarue, Biologie et Multimédia, Sorbonne Université).

Figure TP5.4 (a) Gastrula au stade du bouchon vitellin ; blastopore circulaire bien visible entourant les macromères végétatifs formant le bouchon vitellin, la vue est donc dorso-végétative.

(b) Coupe histologique sagittale (selon le plan de symétrie de l'embryon, région dorsale vers le haut, ventrale vers le bas, future région antérieure de l'embryon à gauche et postérieure à droite). Apparition d'une nouvelle cavité. 1 : ectoderme dorsal ; 2 : mésoderme dorsal ; 3 : archentéron ; 4 : lèvre dorsale du blastopore, mésoderme dorsal postérieur ; 5 : endoderme ; 6 : bouchon vitellin, endoderme ; 7 : lèvre ventrale du blastopore, mésoderme ventral postérieur ; 8 : ectoderme ventral.

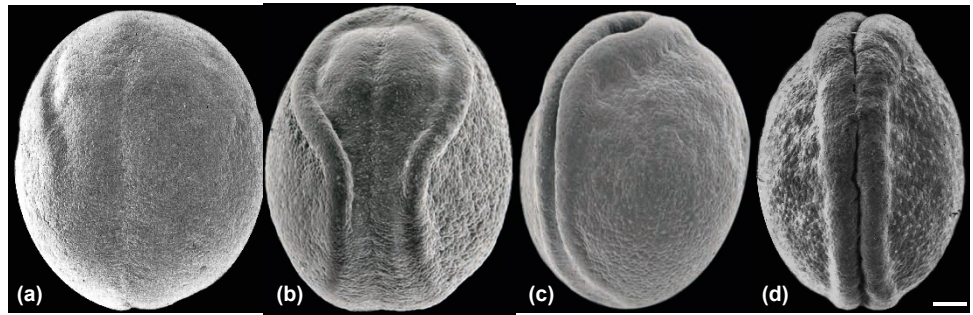


Figure TP5.5 Microscopie électronique à balayage.

Les enveloppes entourant le zygote ont été enlevées. Échelle : 150 μm . (Reproduit avec l'aimable autorisation des Drs. C. Aimar et M. Delarue, Biologie et Multimédia, Sorbonne Université).

Voir chapitre 7, § 4.1

Figure TP5.5, la forme sphérique de l'embryon est perdue au profit d'une élongation antéro-postérieure, sa longueur atteint 1,2 mm. On observe un épaississement de l'ectoderme dorsal (plaque neurale) ; la séquence montre donc différents stades de la neurulation. **(a, b, d)** Vues dorsales, région antérieure vers le haut. **(c)** Vue dorso-latérale droite. Région antérieure vers le haut. **(a)** Épaississement de l'ectoderme, c'est la plaque neurale ; les bourrelets neuraux apparaissent latéralement à la plaque neurale.

(b) Plaque neurale bien formée ; plaque neurale antérieure (céphalique) à l'origine du cerveau prolongée par la plaque neurale médullaire à l'origine de la moelle épinière. Elles sont bordées par les bourrelets neuraux céphaliques et médullaires.

(c) Apposition des bourrelets neuraux dans la région dorsale antérieure ; soulèvement et enroulement dans la région postérieure.

(d) Fusion des bourrelets neuraux dans la région dorsale ; des renflements dans la région antérieure préfigurent les différentes régions du cerveau.

Ces données de microscopie électronique ne renseignent pas sur les événements qui se réalisent à l'intérieur de l'embryon.

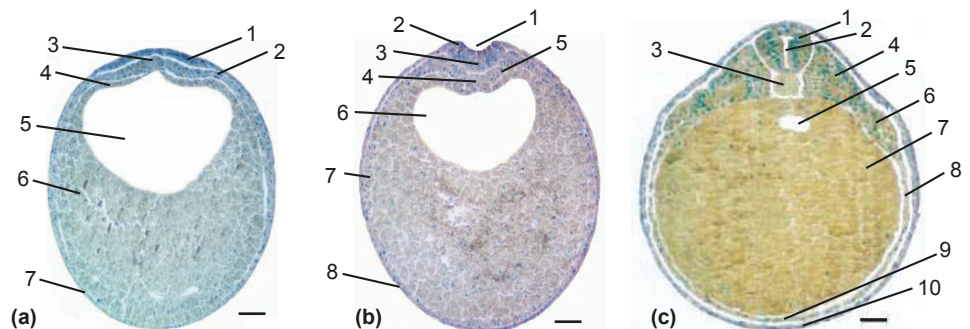


Figure TP5.6 Coupes histologiques.

Les enveloppes entourant le zygote ont été enlevées. Échelles : 100 μm . (Reproduit avec l'aimable autorisation du Dr. M. Delarue, Biologie et Multimédia, Sorbonne Université).

Figure TP5.6, les trois feuilletts caractéristiques du développement des vertébrés sont en place ; réorganisation des tissus en région dorsale ; apparition d'un tube ; il s'agit donc de coupes histologiques transversales de la neurulation. Région dorsale vers le haut, région ventrale vers le bas.

(a) Début de neurulation ; 1 : épaissement de l'ectoderme, formation de la plaque neurale ; 2 : mésoderme dorsal ; 3 : mésoderme axial, la corde ; 4 : toit de la cavité, endoderme ; 5 : cavité, archentéron, future lumière du tube digestif ; 6 : endoderme ; 7 : ectoderme ventral.

(b) Soulèvement des bourrelets neuraux ; enrroulement de la plaque neurale. 1 : gouttière neurale ; 2 : bourrelet neural gauche en cours de soulèvement ; 3 : ectoderme neural, plaque neurale en cours d'enroulement ; 4 : mésoderme axial, la corde ; 5 : mésoderme paraxial ; 6 : cavité, archentéron ; 7 : mésoderme latéral ; 8 : ectoderme ventral.

(c) Fin de neurulation ; tube neural séparé de l'ectoderme, présent dans le plan de symétrie bilatérale dans la région dorsale de la neurula au-dessus du mésoderme axial la corde. 1 : tube neural ; 2 : lumière du tube neural, neurocoele : futurs ventricules du cerveau, futur canal épendymaire de la moelle épinière ; 3 : mésoderme axial, la corde ; 4 : mésoderme paraxial ; 5 : archentéron ; 6 : mésoderme intermédiaire ; 7 : endoderme ; 8 : mésoderme latéral ; 9 : mésoderme ventral ; 10 : ectoderme ventral.

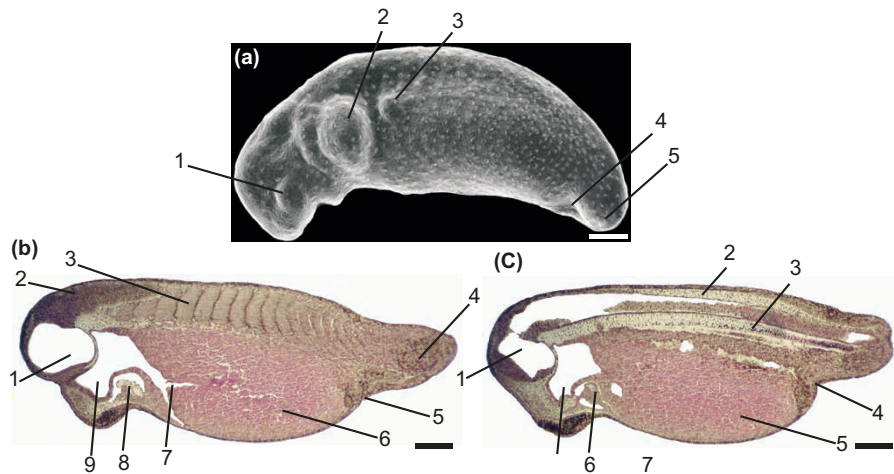


Figure TP5.7 Microscopie électronique à balayage et photonique.

(a) Microscopie électronique à balayage. (b-c) Coupes histologiques. Les enveloppes entourant le zygote ont été enlevées. Échelles : 600 μm .
(Reproduit avec l'aimable autorisation des Drs. C. Aimar et M. Delarue, Biologie et Multimédia, Sorbonne Université).

Figure TP5.7, changement de forme de l'embryon, élongation importante selon l'axe antéro-postérieur : longueur environ 6 mm ; la position des ébauches d'organes selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral permet de les identifier. Il s'agit donc de stades bourgeon caudal à la fin de l'organogenèse ; (a-b) bourgeon caudal, vues latérales gauches ; (c-d) coupes histologiques longitudinales. Région antérieure à gauche.

(a) 1 : ébauche de l'œil, ébauche optique ; 2 : ébauche des branchies ; 3 : ébauche du rein, pronéphros ; 4 : dépression qui marque l'emplacement de l'anus, issu du blastopore ; 5 : ébauche caudale.

(b) L'ectoderme a été enlevé, donnant accès aux structures mésodermiques. 1 : mésoderme intermédiaire, ébauche du rein ; 2 : mésoderme paraxial, somite, métamérisation du corps de l'embryon ; 3 : ectoderme ; 4 : mésoderme latéral recouvrant l'endoderme.

(c) Coupe longitudinale, parasagittale car on voit bien la métamérisation selon l'axe antéro-postérieur. 1 : ébauche de cerveau ; 2 : épithélium du cerveau ; 3 : mésoderme paraxial segmenté, métamérisé, somite ; 4 : bourgeon de queue ; 5 : dépression qui marque l'emplacement de l'anus, issu du blastopore ; 6 : endoderme ; 7 : diverticule hépatique ; 8 : cœur ; 9 : pharynx.

Les différents stades
du développement
de *X. laevis*



<https://bit.ly/xenbase1>

(d) Coupe sagittale car on distingue le mésoderme axial. 1 : ébauche de cerveau ; 2 : région dorsale du tube neural, épithélium du tube neural ; 3 : mésoderme axial, chorde ; 4 : dépression qui marque l'emplacement de l'anus, issu du blastopore ; 5 : endoderme ; 6 : cœur ; 7 pharynx. À la fin de l'organogenèse, le plan d'organisation de l'embryon est achevé. Les ébauches d'organes se sont modelées et leur différenciation en organes fonctionnels est engagée. Le site xenbase donne accès à d'autres illustrations des différents stades du développement de l'amphibien anoure *Xenopus laevis*, représentatif du développement des vertébrés.

2

Exploiter des données de marquage des cellules

Une question importante pour analyser le développement embryonnaire est de parvenir à suivre le développement d'une cellule ou structure dans l'espace et dans le temps. En effet, connaître l'origine des précurseurs d'un territoire est fondamental pour pouvoir les suivre au cours du temps et comprendre les interactions auxquelles ils sont soumis lors du développement de l'embryon. Pour cela, il est indispensable de mettre au point des systèmes de marquage d'une cellule permettant de suivre ses descendants, d'établir son lignage.

a) Technique de marquage fluorescent

Nous avons vu au chapitre 7, que la technique des marques colorées permet de suivre des groupes de cellules et de définir les mouvements auxquels elles participent lors de la gastrulation. Aujourd'hui, l'utilisation de marqueurs fluorescents non métabolisables permet de suivre plus finement la destinée d'une seule cellule. La [figure TP5.8](#) présente les résultats d'une expérience qui consiste à injecter deux marqueurs, l'un vert (dextran couplé à la fluorescéine), l'autre rouge (dextran couplé à la rhodamine) dans deux blastomères adjacents au stade 64 cellules. Cette expérience permet d'établir le lignage des blastomères injectés : c'est-à-dire la carte des devenir des cellules, la carte des potentialités de développement des blastomères injectés.

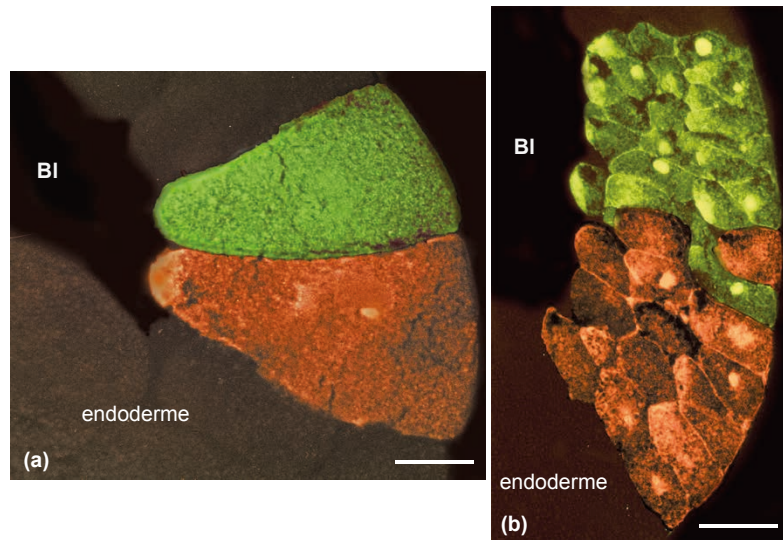


Figure TP5.8 Analyse du lignage cellulaire.

Observation sous microscope à épifluorescence. (a) Stade 64 cellules, trente minutes après l'injection des marqueurs ; (b) fin de segmentation. BI : blastocœle. Échelles : 20 μm . (Reproduit avec l'aimable autorisation du Dr. M. Delarue, Biologie et Multimédia, Sorbonne Université).

(a) L'observation montre que les marqueurs ont diffusé et sont répartis de façon homogène dans tout le cytoplasme. Ils ne diffusent pas de cellule à cellule. (b) Les blastomères injectés ont une hauteur d'environ 80 μm . Les cellules qui en dérivent ont une hauteur d'environ 20-30 μm . Cela reflète la diminution de la taille des cellules lors des mitoses puisque la segmentation se déroule à volume constant de l'embryon. L'observation du lignage obtenu montre qu'à la fin de la segmentation, le tissu en contact avec le blastocœle est composé de 3 couches de cellules : une couche externe et deux couches internes. Elle montre également que la frontière est bien marquée entre le lignage issu de la cellule verte et celui issu de la cellule rouge ; toutefois à la frontière, des cellules semblent se mélanger.

! Attention !

Ne pas confondre lignage cellulaire et lignée cellulaire. Lignée cellulaire : population de cellules capables de se diviser un grand nombre de fois **en culture** tout en conservant leurs principales caractéristiques.

Carte des territoires
présomptifs
de *X. laevis*



<https://bit.ly/xenbase2>

b) Carte des lignages cellulaires

En allant sur le site xenbase vous avez accès à des cartes dynamiques des territoires présomptifs de la blastula obtenues par la méthode présentée dans la figure TP5.8. Elles permettent de voir quels sont les cellules et territoires qui dérivent des différents blastomères injectés aux stades 16 ou 32 cellules. À ces stades, on peut aisément repérer les blastomères par rapport à l'axe PA-PV et dorso-ventral. Au stade 32 cellules, du pôle animal vers le pôle végétatif on distingue 4 rangées de blastomères : a, b, c, et d. Dans la rangée a, et de la région dorsale vers la région ventrale, les blastomères 1, 2, 3, 4 sont repérables et ainsi de suite.

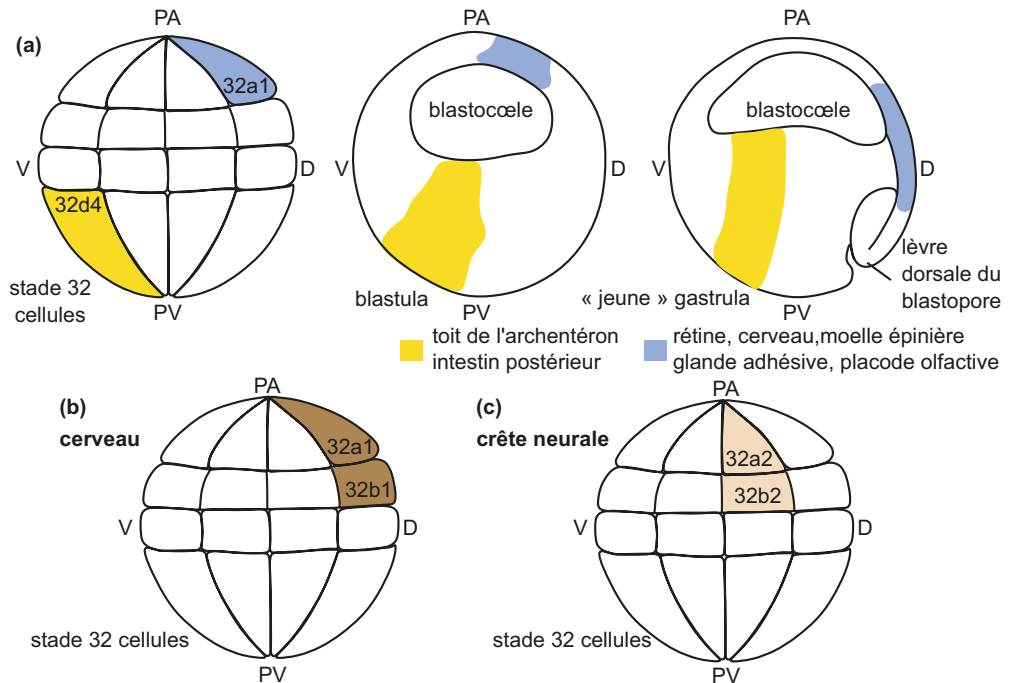


Figure TP5.9 Cartes des lignages.

(a) Lignages des blastomères 32a1 et 32d4. (b) Contribution des blastomères du stade 32 cellules au cerveau. (c) Contribution des blastomères du stade 32 blastomères aux cellules à la crête neurale.

D : dorsal ; PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif ; V : ventral.

Le logiciel permet de faire apparaître les dérivés d'un blastomère donné, que l'on sélectionne d'un clic au stade 16 cellules ou 32 cellules (référéncé stade 6). Les dérivés sont alors présentés sur un schéma d'un embryon en fin de segmentation (stade 8) et en début de gastrulation (stade 10.5). Pour chaque schéma de l'embryon sur ce site, le pôle animal est vers le haut, le pôle végétatif vers le bas, la future région ventrale à gauche et la future région dorsale à droite. En s'aidant de ce site et des données du chapitre 7, on peut dresser une carte des lignages cellulaires au stade 32 cellules. Par exemple, en cliquant sur les blastomères 32a1 et 32d4, on dresse leurs lignages, en ne prenant en compte que les contributions majeures de ces blastomères puisqu'un blastomère donné peut contribuer à différents tissus ou organes (figure TP5.9a).

Le site présente également des cartes « inversées » accessibles en cliquant sur « reverse map ». Le niveau de contribution des blastomères aux tissus et organes est figuré par un code couleur. Le rouge révèle une forte contribution, le vert une faible contribution et l'orange une contribution très rare. À l'aide de ces cartes, on peut rechercher quels sont les blastomères du stade 32 cellules qui contribuent fortement au cerveau (figure TP5.9b) et aux cellules de la crête neurale (figure TP5.9c).

3

Étudier un mouvement de la gastrulation : l'épibolie

Voir chapitre 7, § 3.1a

Au cours de la gastrulation, les cellules de la calotte animale sont engagées dans un mouvement d'épibolie. La figure TP5.10 illustre la séquence des événements cellulaires qui sous-tendent le mouvement d'épibolie.



Figure TP5.10 Microscopie électronique à balayage du toit du blastocœle pendant l'épibolie.

La coloration artificielle : les cellules superficielles en rouge, les cellules en contact avec le blastocœle en vert foncé, les autres cellules en vert clair. Échelle : 30 μm . (Szabó *et al.*, 2016. *Developmental Cell* 37, 213-225).

La séquence présentée dans la figure TP5.10 montre :

- une couche de cellules superficielles (rouges) dont l'épaisseur passe de 30 μm à 10 μm . Elles changent de forme : de cubiques elles deviennent parallélépipédiques ;
- 3 couches de cellules profondes, de dimensions hétérogènes, passent de deux à une couche, avec intercalation des cellules vert clair et vert foncé.

L'épibolie est donc marquée par un changement de forme des cellules externes qui s'aplatissent et par l'intercalation radiaire des cellules des couches profondes. Au total, l'épibolie assure le recouvrement de l'embryon par les cellules à l'origine de l'ectoderme.

Le développement du bourgeon de membre

Activités pratiques

PLAN DU CHAPITRE

- 1 Comparer le développement des membres de deux tétrapodes
- 2 Analyser la croissance proximo-distale du bourgeon de membre
- 3 Analyser la spécification des membres supérieur ou inférieur
- 4 Analyse d'une voie de signalisation paracrine
- 5 Déterminer le rôle des protéines Hox dans la formation des différents segments du membre

INTRODUCTION

La souris, le poulet et l'amphibien sont des organismes modèles très utilisés pour l'expérimentation permettant d'étudier, sur le plan cellulaire et moléculaire, les mécanismes qui gouvernent la mise en place des membres chez les tétrapodes. Ce travail pratique est orienté vers l'utilisation de préparations histologiques et d'expériences réalisées chez ces modèles. Ils vous permettront d'analyser certains événements requis pour le développement du bourgeon de membre.

➔ **Quel est l'apport de l'observation, d'inactivations de gènes et des techniques de greffe à la compréhension du déroulement du développement du bourgeon de membre ?**

1 Comparer le développement des membres de deux tétrapodes

Voir chapitre 8, figure 8.1

Il existe des différences morphologiques et anatomiques entre les membres des vertébrés tétrapodes. La morphogenèse des bourgeons des membres supérieurs peut être comparée chez la souris (*Mus musculus*) et une chauve-souris modèle (*Carollia perspicillata*) à l'aide des résultats de la [figure TP6.1](#) et du [tableau TP6.1](#). Ces animaux représentent les deux plus grands ordres de mammifères (*Rodentia* et *Chiroptera*, respectivement) en termes de nombre d'espèces et sont considérés comme ayant partagé leur plus récent ancêtre commun il y a 60 à 100 millions d'années.

Les points d'attention

- Orientation : identification de la partie distale qui porte les doigts ; du doigt 1 (plus court, orientation oblique par rapport à l'axe proximo-distal) qui marque le pôle antérieur.
- Identification des différents segments (autopode, stylopode, zeugopode).
- Comparaison du nombre des doigts ; des longueurs des rapports longueur du membre/longueur du corps ; des longueurs relatives des différents segments et éventuellement de celles des doigts antérieurs et postérieurs.
- Présence ou absence de tissu entre les doigts.

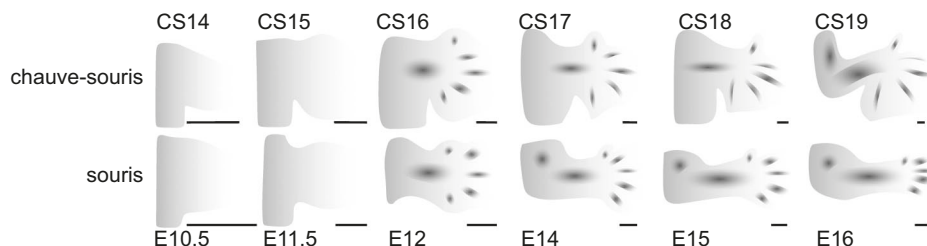


Figure TP6.1 Comparaison entre le développement du bourgeon de membre supérieur chez la chauve-souris et la souris.

Les indications au bas et à gauche de chaque schéma de la souris renseignent sur la durée de la gestation au moment où le schéma est réalisé (E12 : 12 jours de gestation par exemple). La durée de la gestation est de 21 jours chez la souris, 115 jours chez *Carollia perspicillata*.

Les stades de développement de la chauve-souris (CS14, CS15, par exemple), sont placés juste au-dessus des stades correspondants de la souris (E10.5 et E11.5 respectivement). Échelles : 0,5 mm. (D'après Cretekou *et al.*, 2008. *Genes & Development* 22, 141-151).

Tableau TP6.1 Rapports longueur des membres/longueur du corps.

	LM/LC		
	E11,5 - CS15	E16 - CS19	Adultes
Souris	0,19	0,34	0,33
Chauve-souris	0,20	0,98	2,1

Sur la [figure TP6.1](#), les schémas de la chauve-souris et de la souris ne sont pas à la même échelle. Les régions antérieures des bourgeons sont vers le haut des clichés, les régions proximales à gauche. La formation initiale des bourgeons des membres supérieurs semble être conservée entre la chauve-souris et la souris. Dans les deux cas, on observe une croissance proximo-distale des bourgeons avec une longueur proximo-distale des bourgeons de l'ordre de 1 mm aux stades CS15 et E11,5. Ainsi, les morphologies des bourgeons sont similaires jusqu'à ces stades. Les différents segments deviennent distincts plus tardivement : autopode/stylopode à CS16 et E12 ; stylopode/zeugopode à CS17 et E15.

Ensuite, progressivement les différences apparaissent au niveau de l'autopode. À partir de 14 jours de gestation, les espaces interdigitaux disparaissent progressivement chez la souris et perdurent aux stades équivalents chez la chauve-souris. À 15 jours, chez la souris, l'apoptose est complète entre les espaces interdigitaux ; elle est absente chez la chauve-souris même après 19 jours de gestation. Après 17 jours de gestation, chez la chauve-souris, les phalanges s'allongent dans les sens proximo-distal, ce qui est moins marqué chez la souris.

Bien que les patrons globaux des bourgeons soient similaires, toutes les différences dans la morphologie des membres adultes proviennent donc de différences qui s'établissent au cours de la croissance proximo-distale des bourgeons.

Du [tableau TP6.1](#), il ressort que les membres supérieurs s'allongent dans l'axe proximo-distal bien plus pendant le développement de la chauve-souris que chez la souris. En effet, le rapport entre la longueur des membres supérieurs et la longueur du corps est à peu près le même pour la souris (0,19 à E11,5) ou la chauve-souris (0,20 à CS15) au début de la formation des bourgeons. Cependant, pour les stades plus avancés ce rapport a presque quintuplé pour la chauve-souris (de 0,20 à 0,98), comparativement à une augmentation inférieure au double pour la souris (de 0,19 à 0,34). Le rapport de longueur de 0,3 persiste pendant le développement postnatal jusqu'à l'âge adulte pour la souris, tandis que pour la chauve-souris, l'allongement des membres continue de dépasser la croissance corporelle jusqu'à ce que le rapport soit de 2,1 chez l'adulte.

2

Analyser la croissance proximo-distale du bourgeon de membre

On s'intéresse à la mise en place de l'axe proximo-distal. Elle requiert une séquence morphogénétique qui repose sur des signalisations générées par des protéines de la famille des facteurs de croissance fibroblastique (FGF). Les figures ci-dessous présentent les résultats d'expériences concernant les FGF 8 et 10.

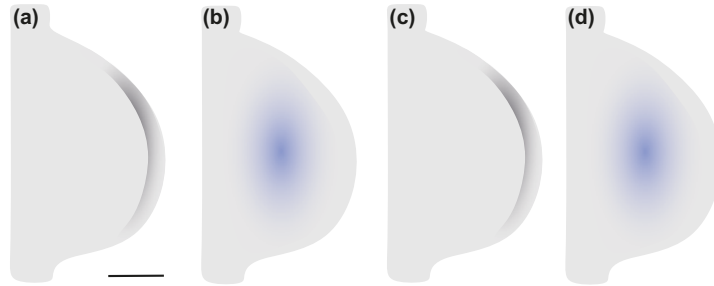


Figure TP6.2 Distribution des FGF au niveau de bourgeons de membres supérieurs.

Schémas d'hybridation *in toto* chez le poulet (**a** et **c**) et la souris (**b** et **d**). (**a** et **b**) Sonde nucléotidique *FGF8* révélée en noir. (**c** et **d**) Sonde nucléotidique *FGF10* révélée en bleu. Vues dorsales.

Région antérieure vers le haut, région postérieure vers le bas. Échelle : 250 µm.

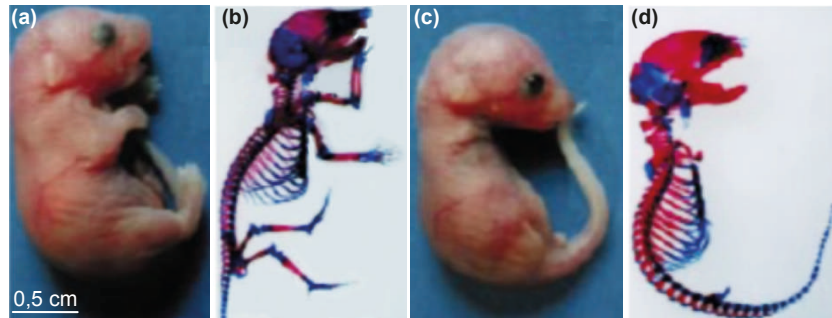


Figure TP6.3 Invalidation du gène codant le FGF10 chez la souris.

Vues latérales droites. (**a**, **c**) Embryons entiers. (**b**, **d**) Coloration des embryons par le rouge alizarine pour révéler les ossifications (rouge) et le bleu alcian pour révéler les cartilages (bleu). (**a**, **b**) Contrôles. (**c**, **d**) Invalidation du gène qui code le FGF 10. (Sekine *et al.*, 1999. *Nature Genetics*, 21, 138-141).

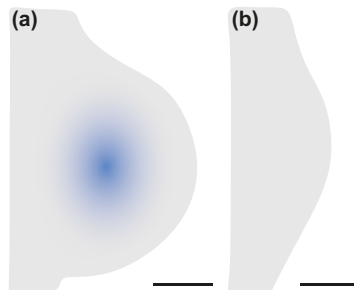


Figure TP6.4 Invalidation du gène codant le FGF8 chez la souris.

Représentation schématique de bourgeons de membre supérieur. Vues dorsales. Hybridations *in toto* avec une sonde nucléotidique *FGF10*. (**a**) Bourgeon de membre dans un contexte sauvage (contrôle). (**b**) Bourgeon de membre issu d'un embryon de souris pour lequel les deux allèles *FGF8* sont mutés. Échelles : 250 µm.

Voir ouvrage
de 1^{re} année,
TP 10, § 3

Les points d'attention

- L'hybridation *in toto* permet de localiser sur un embryon ou un organe entier les territoires où s'exprime un gène d'intérêt (codant ici l'un des facteurs FGF8 ou FGF10) en utilisant une sonde nucléotidique colorable qui s'hybride spécifiquement avec l'ARNm transcrit de ce gène.
- L'inactivation d'un gène met en évidence le rôle de la protéine codée par ce gène en comparant le phénotype des mutants à un phénotype de référence. Un tel protocole peut aussi mettre en évidence des interactions entre gènes, en cherchant l'effet de l'inactivation d'un gène 1 sur l'expression d'un gène 2 (relation d'épistasie).
- Penser à orienter le bourgeon de membre sur les photographies et à en identifier les différents segments.

Figure TP6.2 Les régions proximales des bourgeons de membre sont à gauche. L'hybridation *in toto* permet de détecter et de localiser les ARNm codant le FGF8 (a, b) ou le FGF10 (c, d). Avec la sonde *FGF8*, on observe une coloration à l'extrémité distale des bourgeons chez le poulet et la souris, c'est-à-dire dans la crête apicale ectodermique (AER) du bourgeon de membre. Cela révèle la présence des ARNm *FGF8*. La sonde *FGF10* révèle quant à elle la présence des ARNm dans le mésenchyme des bourgeons.

Les ARNm se distribuent de façon différente entre le mésenchyme (FGF10) et l'ectoderme (FGF8). Cette distribution des ARNm est identique entre la souris et le poulet, ce qui suggère une conservation des mécanismes moléculaires, entre ces espèces, permettant la mise en place de l'axe proximo-distal.

Figure TP 6.3 L'inactivation du gène codant le FGF10 est entreprise pour analyser la fonction de la protéine qu'il code lors de l'organogenèse des membres. Chez le contrôle, on distingue les trois segments. Chez le mutant, l'absence de FGF10 conduit à la disparition du zeugopode et de l'autopode des membres supérieurs et inférieurs. Le stylopode est très réduit (humérus, fémur). La signalisation FGF10 est donc requise pour la mise en place proximo-distale et particulièrement la croissance proximo-distale des bourgeons. Le fait que l'humérus et le fémur soient présents mais très réduits suggère qu'en absence de FGF10 l'induction du bourgeon s'est réalisée mais pas son initiation et par conséquent sa croissance proximo-distale.

Figure TP6.4 L'inactivation du gène codant le FGF8 est entreprise pour analyser les effets de la protéine qu'il code sur l'expression du gène *FGF10*, elle-même analysée par hybridation *in toto*. La coloration bleue est observable dans le mésenchyme du bourgeon contrôle (a), l'ARNm *FGF10* est présent. Le bourgeon de membre pour lequel le gène *FGF8* est invalidé montre l'absence de coloration dans le mésenchyme, l'ARNm *FGF10* est donc absent suggérant que la signalisation FGF8 active la transcription du gène *FGF10* dans le mésenchyme. Puisque les deux figures sont à la même échelle, une réduction de la croissance proximo-distale du bourgeon est clairement identifiable en absence de *FGF8*.

L'ensemble de ces trois expériences montre que les ARNm *FGF8* et *10* sont présents respectivement dans l'AER et le mésenchyme ; que le FGF10 est requis pour l'initiation de la formation du bourgeon de membre ; que le FGF8 permet l'expression du FGF10 dans le mésenchyme et qu'ils sont tous les deux requis pour la croissance proximo-distale du bourgeon de membre.

Voir chapitre 8,
figure 8.4

Voir chapitre 8,
figure 8.8

3

Analyser la spécification des membres supérieur ou inférieur

Les bourgeons des membres doivent être spécifiés comme étant ceux du membre supérieur ou du membre inférieur. Deux facteurs de transcription ont été identifiés : des hybridations *in toto* ont montré que le gène codant pour le facteur de transcription Tbx5 est transcrit dans les mésenchymes des membres supérieurs du poulet et de la souris, tandis que le gène codant pour le facteur de transcription Tbx4 est exprimé dans les mésenchymes des membres inférieurs. Leur

localisation au bon endroit et au bon moment a conduit à réaliser des expériences pour déterminer si ces facteurs de transcription interviennent dans la spécification des membres supérieurs ou inférieurs. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la [figure TP6.5](#).

Figure TP6.5 Le FGF est un facteur de croissance, il va diffuser à partir des billes dans le mésoderme latéral. En **(b)**, on observe l'apparition d'un bourgeon de membre entre le bourgeon du membre supérieur et inférieur (bourgeon ectopique). Le FGF a donc généré une signalisation paracrine conduisant à l'établissement d'un bourgeon de membre induit. Il est de taille plus réduite que le bourgeon du membre supérieur ou inférieur.

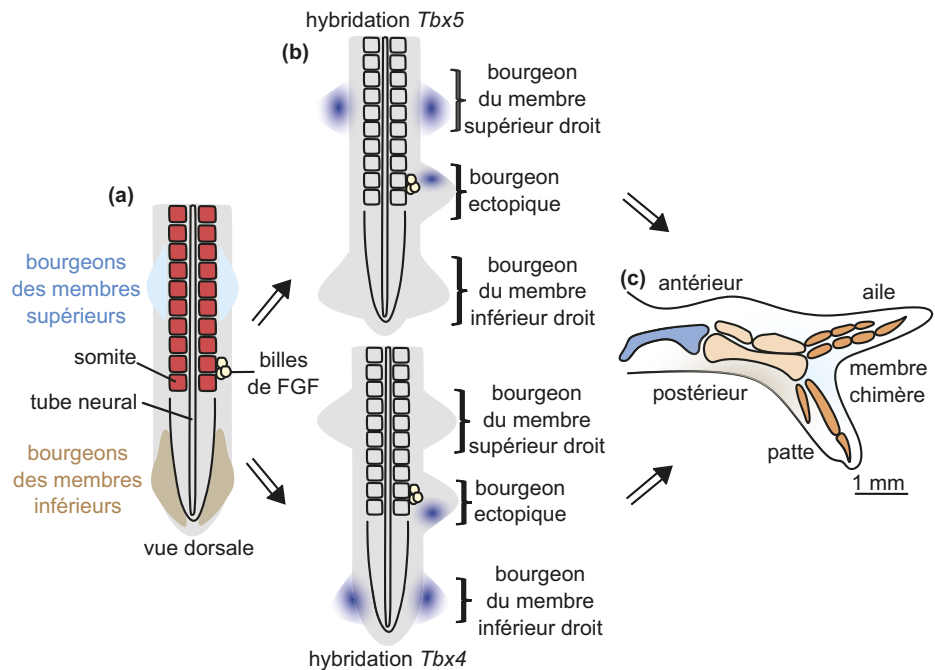


Figure TP6.5 Analyse de la spécification des bourgeons de membres.

(a) Chez l'embryon de poulet, des billes imprégnées de FGF sont greffées dans le mésoderme latéral à égale distance des bourgeons de membre supérieur et inférieur au moment de leur initiation.

(b) Quelques heures après la greffe, des hybridations *in toto* sont réalisées avec des sondes nucléotidiques *Tbx5*, *Tbx4* sur deux embryons ayant reçu une greffe. Échelles : 1 mm. **(c)** Représentation schématique du membre obtenu. Régions antérieures vers le haut de la figure, régions postérieures vers le bas. (D'après Ohuchi *et al.*, 1998. *Development* 125, 51-60).

Les hybridations *in toto* montrent que l'ARNm *Tbx5* se trouve dans le mésenchyme du bourgeon de membre supérieur, tandis que l'ARNm *Tbx4* est distribué dans le mésenchyme du bourgeon de membre inférieur. Les bourgeons des membres contenant l'ARNm *Tbx5* produisent des ailes, tandis que les bourgeons des membres contenant l'ARNm *Tbx4* génèrent des pattes.

Au niveau du bourgeon induit, on observe que l'ARNm *Tbx5* est présent dans sa région antérieure et l'ARNm *Tbx4* dans sa région postérieure.

En **(c)**, le membre développé par le bourgeon de membre induit est un membre surnuméraire chimère : sa région antérieure est de type aile, sa région postérieure de type patte.

Ainsi, étant donné que les patrons d'expressions de *Tbx5/Tbx4* dans le bourgeon ectopique du membre induit sont étroitement corrélés avec le patron du phénotype du membre surnuméraire chimérique, on peut conclure que les facteurs de transcription *Tbx5* et *Tbx4* sont respectivement impliqués dans la spécification de l'identité membre supérieur/inférieur.

4 Analyse d'une voie de signalisation paracrine

L'organogenèse des membres des tétrapodes est contrôlée spatio-temporellement par des signalisations paracrines. Elles confèrent des identités de position selon les trois axes des membres. On s'intéresse ici à l'une de ces voies de signalisation, celle générée par le morphogène Sonic hedgehog (Shh). Deux expériences sont présentées dans les figures ci-dessous.

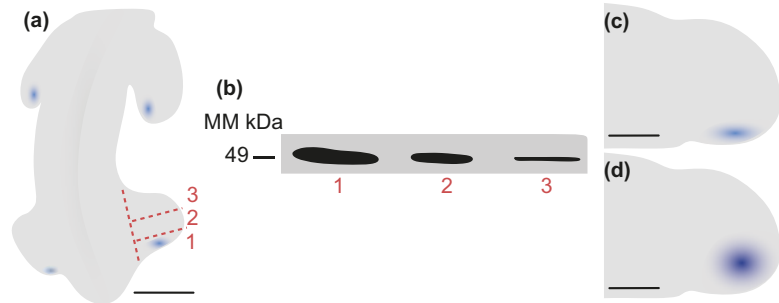


Figure TP6.6 Analyse de la voie de signalisation paracrine Shh.

(a) Représentation schématique d'une hybridation *in toto* avec une sonde nucléotidique *Shh*, réalisée chez le poulet. Vue dorsale. Région antérieure vers le haut. Échelle : 0,5 mm.

(b) Western blot réalisé avec des anticorps dirigés contre la protéine Shh à partir des protéines extraites, après microdissection, des régions 1, 2 et 3 du bourgeon. Elles sont figurées sur la figure (a) par des traits pointillés rouges. (c, d) Représentation schématique d'une hybridation *in toto*, avec une sonde nucléotidique *Shh* (c) ou *Gli* (d), réalisées chez la souris. La protéine Gli est un messenger secondaire de la voie de signalisation Shh dont le gène est un des gènes cibles de la voie. Région antérieure vers le haut, proximale à gauche. Échelles : 0,25 mm.

(D'après Lopez-Rios *et al.*, 2014. *Nature* 511, 46-50).

Voir chapitre 8,
zoom 1

Les points d'attention

- L'identification d'un ARNm d'intérêt sur l'embryon entier (*in toto*) par hybridation avec des sondes nucléotidiques permet de repérer les zones où il est transcrit (pas de diffusion de l'ARNm hors des cellules).
- La localisation de la protéine codée par cet ARNm, révélée spécifiquement par western blot peut être différente de celle de l'ARNm si la protéine est diffusible.

Figure TP6.6a L'hybridation révèle un fort marquage dans la région postérieure des quatre bourgeons de membres chez le poulet. L'ARNm *Shh* est donc localisé dans le mésenchyme de cette région.

Figure TP6.6b Le western blot montre que la protéine Shh est présente dans les différentes régions du bourgeon analysé. La taille des bandes varie traduisant le fait que sa quantité diminue de la région 1 à 3. Cela indique qu'il y a un gradient de distribution de la protéine : maximum dans la région postérieure et minimum dans la région antérieure du bourgeon. Ainsi, les résultats des figures a et b indiquent que l'ARNm *Shh* est restreint à la région postérieure du bourgeon : la ZPA. Ils indiquent également que la protéine diffuse de la région postérieure vers la région antérieure du bourgeon.

Figure TP6.6c L'hybridation réalisée chez la souris montre la même distribution de l'ARNm *Shh* que chez le poulet, suggérant une conservation des mécanismes de l'organogenèse des membres entre les espèces de vertébrés.

Figure TP6.6d D'après l'hybridation, l'ARNm *Gli* est présent et distribué de façon diffuse dans le mésenchyme de la moitié postérieure du bourgeon. Si l'ARNm est présent c'est que le gène *Gli* est transcrit et que donc la voie de signalisation Shh est fonctionnelle dans cette région du bourgeon.

Au total, ces résultats montrent que les ARNm *Shh* sont localisés dans la région postérieure du bourgeon, la ZPA, que cette localisation est conservée entre les espèces de vertébrés, que la protéine Shh diffuse dans le mésenchyme et génère une voie de signalisation paracrine activant la transcription du gène *Gli*.

Figure TP6.7 Les résultats majeurs issus de l'analyse des phénotypes sont résumés dans le tableau TP6.1.

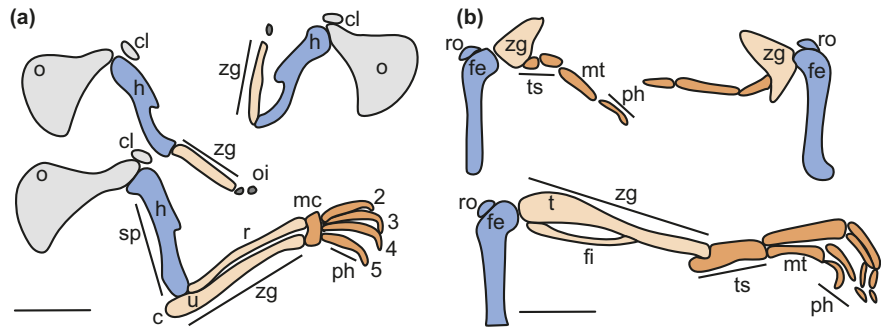


Figure TP6.7 Analyse des phénotypes obtenus après invalidation du gène *Sonic hedgehog*.

Représentations schématiques des squelettes des membres de souris âgée de 3 semaines. **(a)** Membre supérieur ; **(b)** membre inférieur. Les membres gauche et droit sont présentés en haut des figures respectivement à droite et gauche. Les membres supérieurs et inférieurs de type sauvage sont représentés en bas des figures. Échelles : 1 mm.

cl : clavicule ; c : coude ; fe : fémur ; fi : fibula ; h : humérus ; mc : métacarpes ; o : omoplate ; oi : élément squelettique flottant ; ph : phalanges ; r : radius ; ro : rotule ; sp : stylopoode ; t : tibia ; ts : tarses ; u : cubitus ; zg : zeugopode. (D'après Sagai *et al.*, 2005. *Development* 132, 797-803).

Tableau TP6.1 Phénotypes observés après l'invalidation du gène *Shh*.

	membre supérieur (figure TP6.7a)	membre inférieur (figure TP6.7b)
ceintures, stylopoodes	omoplate et stylopoode (humérus) normaux	stylopoode (fémur) normal
zeugopodes	incomplet : un seul os ; longueur réduite	incomplet : tibia et la fibula fusionnés en une masse squelettique compacte unique dont la croissance proximo-distale n'a pas dû se réaliser
autopodes	absent à l'exception d'une structure osseuse flottante	un seul doigt (un tarse, un métatarse et une ou deux phalanges)

Au total ces deux séries d'expériences permettent d'aborder la fonction de la voie de signalisation paracrine Shh. Elles démontrent que la ZPA est un centre organisateur qui confère une information de position antéro-postérieure aux bourgeons de membre supérieur et inférieur pour mettre en place les structures des zeugopodes et des autopodes : radius/tibia dans la région antérieure et ulna/fibula dans la région postérieure des zeugopodes ; positionnement et nombre des doigts des autopodes.

5

Déterminer le rôle des protéines *Hox* dans la formation des différents segments du membre

Voir chapitre 8,
zoom 3

Le phénotype du membre (supérieur ou inférieur) est établi avant son apparition et dépend de la hauteur somitique à laquelle est initié le bourgeon. C'est un profil spécifique d'expression des gènes maîtres *Hox* qui détermine l'identité des segments des membres. La figure TP6.8 présente quelques résultats obtenus après invalidation des gènes *HoxA*, *HoxD*.

Figure TP6.8a Le membre supérieur déficient pour l'ensemble des protéines *HoxA* et *HoxD* est considérablement tronqué : humérus réduit et suivi d'une structure désorganisée préfigurant la formation d'un zeugopode. Le membre supérieur mutant semble être retardé dans son développement, sa structuration pourrait être arrêtée à un stade précoce du développement du bourgeon de membre. Ainsi, l'expérience montre que les facteurs de transcription produits par les clusters de gènes *HoxA* et *D* sont impliqués dans le développement des membres du stylopode à l'autopode.

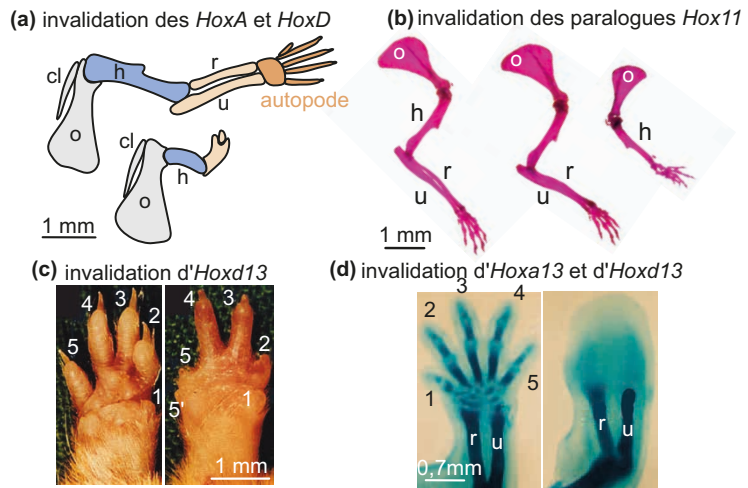


Figure TP6.8 Invalidation des gènes *HoxA* et *HoxD* ou de leurs paralogues chez la souris. Les résultats pour les membres supérieurs sont présentés.

Des résultats comparables sont constatés pour les membres inférieurs.

- (a)** En haut schéma du squelette du membre sauvage, en bas du membre muté.
(b) À gauche, membre sauvage ; au centre invalidation du gène *Hoxd11* ; à droite double invalidation *Hoxa11* et *Hoxd11*. (D'après Davis *et al.*, 1995. *Nature* 375, 791-95).
(c) Extrémité distale du membre sauvage à gauche, du membre mutant à droite. (Dollé *et al.*, 1993. *Cell* 75, 431-441).
(d) À gauche, zeugopode et autopode du membre sauvage, à droite ceux du mutant. (Fromental-Ramain *et al.*, 1996. *Development* 122, 2997-3011).
 h : humérus ; o : omoplate ; r : radius ; u : ulna.

Figure TP6.8b L'inactivation des paralogues 11, c'est-à-dire la double inactivation des gènes *Hoxa11* et *Hoxd11*, affecte sévèrement la formation du zeugopode dans le membre supérieur : il est absent. L'autopode est directement fixé à l'humérus. Ce résultat suggère que les facteurs de transcription *Hoxa11* et *Hoxd11* sont nécessaires pour activer des gènes requis pour spécifier le développement du zeugopode. Il suggère également des fonctions redondantes pour les produits des gènes paralogues 11.

Figure TP6.8c Le mutant *Hoxd13* dans le membre supérieur montre une réduction de la taille des doigts, en particulier pour les doigts 2 et 5. Cinq doigts sont néanmoins présents et un doigt

rudimentaire supplémentaire 5' apparaît en arrière du doigt 5. Ceci suggère que la protéine Hoxd13 contrôle la formation des doigts.

Figure TP6.8d L'inactivation des gènes situés le plus en 5' des complexes *HoxA* et *HoxD*, soit les gènes *Hoxa13* et *Hoxd13*, cause des défauts de formation de la structure la plus distale du membre, à savoir l'autopode qui a une forme arrondie sans signe apparent de formation des doigts. Le zeugopode, radius et ulna, semble bien développés bien que de taille réduite. Les fonctions des protéines codées par les paralogues *Hox13* semblent donc être redondantes et essentielles à la formation des doigts dans l'autopode.

Au total, ces expériences montrent que les clusters A et D organisent la structuration du membre du stylo-pode, à l'autopode. Le zeugopode est structuré par les facteurs de transcriptions codés par les gènes Hox du groupe paralogue 11. La formation de l'autopode requiert les protéines Hoxa13 et Hoxd13. Ces expériences montrent également que la formation des éléments squelettiques du membre reflète la position du gène dans le complexe : les gènes situés en 3' du cluster sont exprimés précocement et structurent la région proximale, tandis que les gènes situés en 5' sont exprimés tardivement et structurent la région distale (autopode).

S'entraîner

Sujet sur documents (analyse et mise en relation)

Les figures TP6.9 et 10 résument les résultats d'expériences entreprises chez le poulet. Elles ont pour objet d'analyser le rôle de l'acide rétinoïque (AR) dans l'initiation de la morphogenèse du bourgeon de membre.

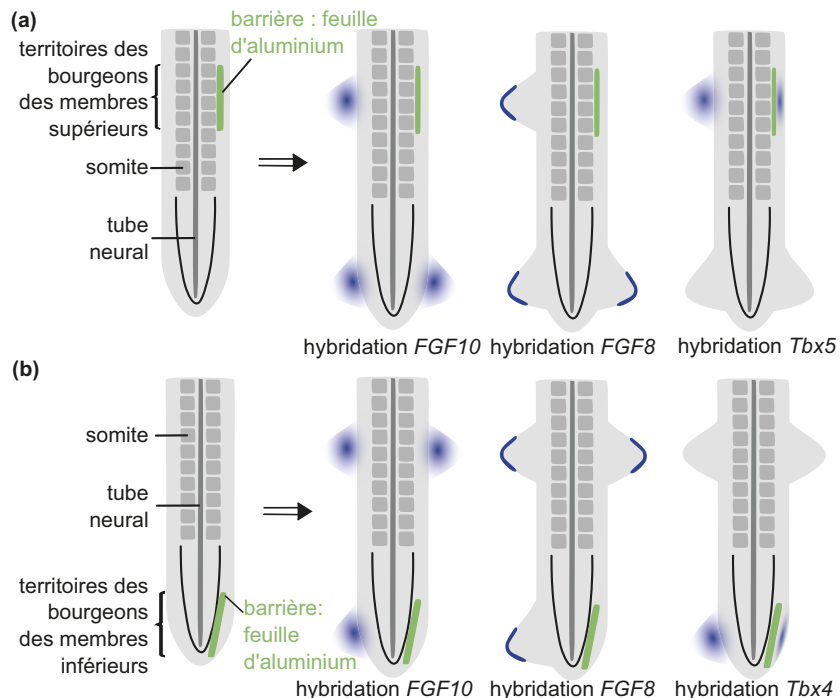


Figure TP6.9 Schémas de vues dorsales d'embryons de poulet.

(D'après Nishimoto *et al.*, 2015. Cell Reports 12, 879–891).

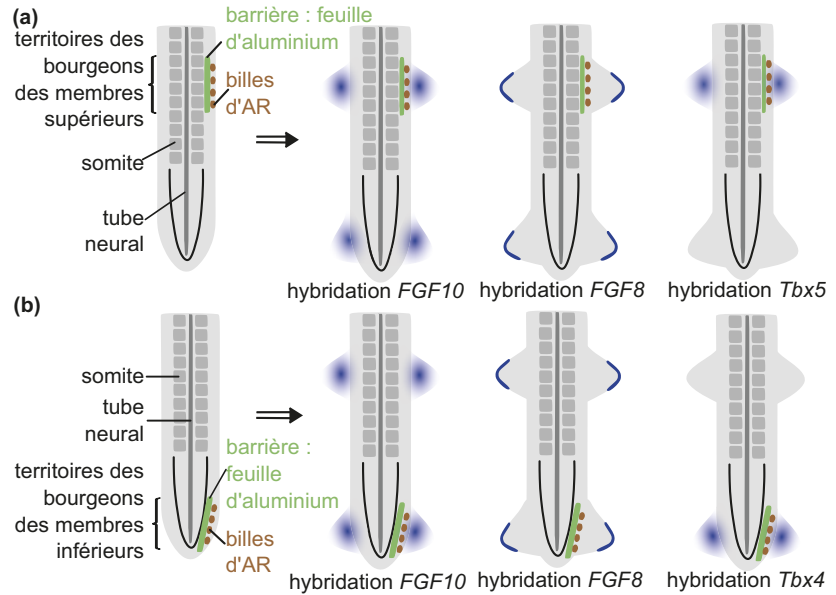


Figure TP6.10 Schémas de vues dorsales d'embryons de poulet.

AR : acide rétinoïque. (D'après Nishimoto *et al.*, 2015. *Cell Reports* 12, 879-891).

Figure TP6.9 : une feuille d'aluminium (0,7 mm d'épaisseur) est insérée entre les somites et le mésoderme latéral au niveau du territoire d'un bourgeon alaire (a) ou au niveau du territoire d'un bourgeon de patte (b). Après quelques heures de développement, des hybridations *in situ* avec des sondes nucléotidiques *FGF10*, *FGF8*, *Tbx5* ou *Tbx4* sont réalisées.

Figure TP6.10 : une feuille d'aluminium (0,7 mm d'épaisseur) et des billes d'agarose préalablement imprégnées d'AR sont insérées entre les somites et le mésoderme latéral au niveau du territoire d'un bourgeon alaire (a) ou au niveau du territoire d'un bourgeon de patte (b). Après quelques heures de développement des hybridations *in situ* avec des sondes nucléotidiques *FGF10*, *FGF8*, *Tbx5* ou *Tbx4* sont réalisés.

- 1 Analysez et interprétez les résultats des expériences.
- 2 Mettez en relation les résultats obtenus pour proposer un schéma présentant un modèle des relations entre l'AR, les gènes *FGF10*, *FGF8*, *Tbx5*, *Tbx4* lors de l'initiation de la morphogénèse des bourgeons de membre.