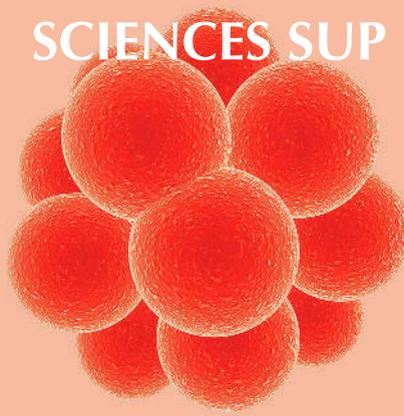
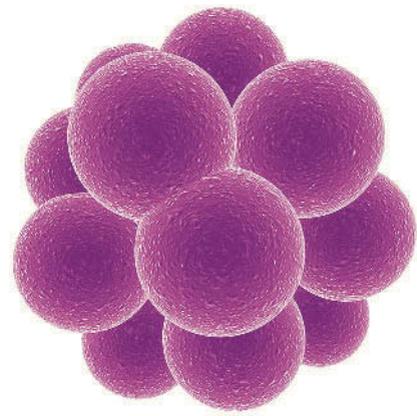


SCIENCES SUP



Cours et questions de révision

Licence • Master • CAPES

BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT

7^e édition

*Albert Le Moigne
Jean Foucrier*

DUNOD

BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT

Consultez nos parutions sur dunod.com

Dunod Éditeur, édition de livres, Microsoft Press, ETSF, Edisience, InterEditions

Recherche Collections Index français

Mon compte

DUNOD Edisience ETSF InterEditions Microsoft Press

Accueil Contacts

Sciences et techniques Informatique Gestion et Management Sciences Humaines

Interviews

Réinventer les RH (urgence !)
Gilles Verrier

Baccus 2008 : exigez la nouvelle formule !
Thierry de Montfort

toutes les interviews

Club Enseignants
Annie Levesque

Evénements

Découvrez le **Python**
Professeur dirigeant

En librairie ce week-end
Développement personnel et coaching : découvrez le **PROFESSEUR DIRIGEANT**
www.editionsdunod.com

Bacchus
2008
Cécile Pirelle
Cécile Pirelle
Cécile Pirelle

Profession dirigeant
Cécile Pirelle
Cécile Pirelle
Cécile Pirelle

PYTHON
2008
Tarek Zaidi
Tarek Zaidi
Tarek Zaidi

150 exercices de psychologie de sport
Yves Frotet
Patrick Leger, Elisabeth Fustel de Ranville, Romaine

LES BIBLIOTHÈQUES DES PROFESSEURS

- Bibliothèque du DB
- Gestion industrielle
- Métiers de la vigne et du vin
- Marketing et Communication
- Directeur d'établissement social et médico-social
- Toutes les bibliothèques

LES NEWSLETTERS

- Action sociale
- Psychologue
- Développement personnel relation dnc
- Entreprise
- Expertise comptable
- Informatique et TIC
- Industrie
- Toutes les newsletters

bibliothèques des professeurs newsletters Microsoft Press Edisience.net capes@sup.com
lance@style

BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT

Albert Le Moigne

Professeur honoraire de l'université Paris XII Val de Marne

Jean Foucrier

Professeur à l'université Paris XII Val de Marne

7^e édition revue et corrigée

DUNOD

Illustration de couverture :
© Joseppi, Fotolia

Le pictogramme qui figure ci-contre mérite une explication. Son objet est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, particulièrement dans le domaine de l'édition technique et universitaire, le développement massif du photocopillage.

Le Code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit en effet expressément la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Or, cette pratique

d'enseignement supérieur, provoquant une baisse brutale des achats de livres et de revues, au point que la possibilité même pour

les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée. Nous rappelons donc que toute reproduction, partielle ou totale, de la présente publication est interdite sans autorisation de l'auteur, de son éditeur ou du Centre français d'exploitation du

droit de copie (CFC, 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).



© Dunod, Paris, 2001, 2004, 2009

© Masson, Paris, 1979, 1989, 1995, 1997

ISBN 978-2-10-054127-0

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2^o et 3^o a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos

XV

PARTIE I GAMÉTOGÈSE ET FÉCONDATION

Chapitre 1 • Généralités sur la gamétogenèse – la méiose	3
1.1 Comparaison entre la spermatogenèse et l'ovogenèse	4
1.1.1 Ressemblances	4
1.1.2 Différences	4
1.2 Déroulement de la méiose	5
1.2.1 Synthèses d'ADN pendant le stade préleptotène	7
1.2.2 Prophase de la première division de méiose	7
1.2.3 Fin de la première division	8
1.2.4 Seconde division de méiose	9
Chapitre 2 • Spermatogenèse	10
2.1 Structure d'un testicule de Mammifère	10
2.1.1 Organisation générale	10
2.1.2 Structure du tissu interstitiel	10
2.1.3 Structure d'un tube séminifère	11
2.2 Les cellules germinales	15
2.2.1 Les spermatogonies	15
2.2.2 Les spermatocytes	15
2.2.3 Les spermatides	16
2.3 La spermiogenèse	17
2.3.1 Modifications morphologiques	17
2.3.2 Synthèses au cours de la spermiogenèse	19
2.4 Morphologie et biologie des spermatozoïdes mûrs	20
2.4.1 Morphologie	20
2.4.2 Biologie	22
2.4.3 Anomalies de la spermatogenèse	25
2.5 Les hormones sexuelles et le contrôle de la gamétogenèse	26
2.5.1 Caractères communs aux deux sexes	26
2.5.2 Contrôle hormonal de la spermatogenèse	28
Chapitre 3 • Ovogenèse	32
3.1 Développement des cellules reproductrices et du follicule ovarien	32
3.1.1 Ovogonies	32
3.1.2 Ovocytes	33
3.1.3 Développement des follicules ovariens	35

Table des matières

3.2	Hormones sexuelles et contrôle de l'ovogenèse	41
3.2.1	Activités hormonales pendant la croissance du follicule ovarien des Mammifères	42
3.2.2	Activités hormonales après l'ovulation	46
3.2.3	Préparation de la muqueuse utérine par les hormones stéroïdes sexuelles	47
3.3	Synthèses dans l'ovocyte pendant l'ovogenèse	47
3.3.1	Synthèses dans l'ovocyte d'Amphibiens	48
3.3.2	Synthèses dans l'ovocyte de Mammifères	57
3.4	Maturation de l'ovocyte	59
3.4.1	Manifestations morphologiques : achèvement de la première division de méiose et arrêt en métaphase de seconde division	59
3.4.2	Mécanisme de la maturation	60
3.4.3	Réactivation des synthèses à la maturation	61
3.5	L'ovogenèse chez la drosophile	62
3.5.1	Organisation de l'ovaire et des ovarioles	62
3.5.2	Les synthèses d'ARN	63
3.5.3	La vitellogenèse	63
3.5.4	L'établissement de la polarité de l'ovocyte et son contrôle par des gènes régulateurs	64
3.6	Résultat de l'ovogenèse : complexité de la cellule œuf	68
3.6.1	Structure de l'œuf	68
3.6.2	Existence des localisations cytoplasmiques particulières dans l'œuf	69
3.6.3	Effets maternels sur le développement	70
Chapitre 4 • Fécondation		73
4.1	Rencontre de l'ovule et des spermatozoïdes	73
4.1.1	Mécanismes de rencontre chez l'oursin, un animal à fécondation externe	74
4.1.2	Mécanismes de rencontre chez un Mammifère, un animal à fécondation interne	74
4.2	Reconnaissance et adhérence des gamètes	75
4.2.1	Adhérence des gamètes chez un Invertébré : l'oursin	75
4.2.2	Adhérence des gamètes chez les Mammifères	76
4.2.3	Fusion des gamètes	79
4.3	Réactions membranaires de l'œuf	81
4.3.1	Modifications au niveau de la membrane ovocytaire et leurs conséquences	81
4.3.2	Formation de la membrane de fécondation : barrière à la polyspermie	84
4.4	Rétablissement de la diploïdie par fusion des pronuclei	87
4.4.1	Formation des pronuclei et du spermaster	88
4.4.2	Fusion des noyaux, ou amphimixie	89
4.5	Conséquences de la fécondation du point de vue structural et métabolique	89
4.5.1	Remaniements structuraux	89
4.5.2	Changements métaboliques	90
4.6	La parthénogenèse	93
4.6.1	Expériences de parthénogenèse expérimentale	93
4.6.2	Interprétation de ces expériences	94

PARTIE 2
EMBRYOLOGIE DESCRIPTIVE

Chapitre 5 • Généralités	99
5.1 Segmentation	99
5.1.1 La nature des œufs détermine le type de segmentation	99
5.1.2 Segmentation totale (ou holoblastique)	100
5.1.3 Segmentation partielle (ou méroblastique)	102
5.2 Gastrulation	102
5.3 Organogenèse	103
Chapitre 6 • Développement de l'oursin	105
6.1 Segmentation	105
6.2 Gastrulation	106
Chapitre 7 • Développement d'un insecte	108
7.1 Segmentation et formation du blastoderme	108
7.2 Gastrulation et neurulation	109
Chapitre 8 • Développement des Amphibiens	114
8.1 Structure de l'œuf d'Amphibien	114
8.1.1 Œuf vierge	114
8.1.2 Modifications des structures cytoplasmiques à la fécondation	115
8.1.3 Rétraction de l'œuf dans ses enveloppes : rotation d'orientation (ou d'équilibration)	115
8.1.4 Formation du croissant gris, acquisition du plan de symétrie de l'embryon : rotation de symétrisation	116
8.2 Segmentation	117
8.3 Gastrulation	118
8.3.1 Manifestations externes de la gastrulation	118
8.3.2 Carte des territoires présomptifs	120
8.3.3 Interprétation des mouvements morphogénétiques lors de la gastrulation	122
8.4 Neurulation	124
8.4.1 Différenciation du neurectoderme	125
8.4.2 Évolution du mésoderme et de l'endoderme	125
8.5 Évolution des feuilletés après la neurulation	126
8.5.1 Ectoderme	126
8.5.2 Mésoderme	128
8.5.3 Endoderme	129
8.6 La métamérisation chez les Vertébrés	129

Table des matières

Chapitre 9 • Développement des Oiseaux	131
9.1 Structure de l'œuf d'Oiseau	131
9.1.1 Organisation de l'œuf et de ses enveloppes	131
9.1.2 Acquisition de l'orientation de l'embryon	131
9.2 Segmentation	133
9.3 Gastrulation	133
9.3.1 Mise en place de l'hypoblaste	135
9.3.2 Formation de la ligne primitive	136
9.3.3 Mise en place de l'endoderme et du mésoderme	136
9.4 Neurulation	139
9.4.1 Mouvements généraux des feuilletts	139
9.4.2 Nœud de Hensen et ligne primitive	141
9.5 Annexes embryonnaires	142
9.5.1 Vésicule vitelline	143
9.5.2 Cavité amniotique	144
9.5.3 Allantoïde	144
9.5.4 Destinée des annexes après l'éclosion	145
Chapitre 10 • Développement des Mammifères	147
10.1 Structure de l'œuf et de ses enveloppes	147
10.2 Segmentation	148
10.2.1 Morula et blastula primaire (ou blastocyste primaire)	148
10.2.2 Blastula secondaire (ou blastocyste secondaire)	151
10.3 Gastrulation	151
10.4 Neurulation	153
10.5 Développement de l'amnios et de la vésicule vitelline	154
10.5.1 Formation de l'amnios	154
10.5.2 Formation de la vésicule vitelline	154
10.5.3 L'embryon à la fin de l'amniogenèse	155
10.6 Évolution des annexes embryonnaires et formation du placenta	155
10.6.1 Évolution de l'amnios	155
10.6.2 Évolution de la vésicule vitelline	155
10.6.3 Évolution de l'allantoïde	156
10.6.4 Développement du placenta	156
10.7 Rapports entre les parties maternelles et embryonnaires du placenta	157
10.7.1 Placentas indéciduels	157
10.7.2 Placentas déciduels	159
10.7.3 Physiologie du placenta	159

Partie 3

MÉCANISMES DE LA MORPHOGENÈSE

Chapitre 11 • Contrôle génétique du développement	163
11.1. Les facteurs de transcription et les protéines inductrices	164
11.1.1 Les facteurs de transcription	164
11.1.2 Les protéines inductrices	166
11.2 Support génétique du développement précoce de l'embryon de drosophile	174
11.2.1 Les gènes de polarité	174
11.2.2 Organisation dorso-ventrale de l'embryon	176
11.2.3 Les gènes de segmentation	177
11.2.4 Les gènes sélecteurs homéotiques	181
11.2.5 Différenciation d'un tissu ou d'une ébauche génétiquement programmée	186
11.3 Les gènes régulateurs dans le développement des Vertébrés	187
11.3.1 Les gènes sélecteurs homéotiques dans la différenciation antéro-postérieure du corps	187
11.3.2 Expression de plusieurs gènes homéotiques dans la différenciation du rhombencéphale et des crêtes neurales	191
11.3.3 La modification du domaine d'expression d'un gène modifie l'identité de l'organe qui s'y différencie	193
11.3.4 Les gènes sélecteurs homéotiques dans la différenciation d'organes polarisés : les membres des Vertébrés	195
11.3.5 Autres gènes organisateurs régionaux des Vertébrés, apparentés aux gènes de la drosophile	200
Chapitre 12 • Analyse de la segmentation	204
12.1 Activité mitotique pendant la segmentation	205
12.2 Localisations embryonnaires résultant de la segmentation	206
12.2.1 Caractère général des localisations cytoplasmiques dans l'œuf	206
12.2.2 Œufs à développement en mosaïque	207
12.2.3 Œufs à régulation	211
12.3 Œufs à régulation et détermination des territoires	211
12.3.1 Oursins	211
12.3.2 Amphibiens	213
12.3.3 Oiseaux	216
12.3.4 Mammifères	216
12.4 Premières synthèses de protéines après la fécondation	219
12.4.1 Accroissement du taux de synthèses des protéines au début du développement	220
12.4.2 Premières synthèses de protéines, traduction des ARN-m maternels : cas des Oursins et des Amphibiens	220
12.4.3 Traduction des ARN-m maternels pendant la segmentation chez les embryons de Mammifères	222

Table des matières

12.4.4	Régulation de la traduction des ARN-m maternels pendant la segmentation chez les Amphibiens	223
12.5	Induction du mésoderme par l'endoderme chez les Amphibiens	224
12.5.1	Une aire mésodermique est progressivement déterminée dans la zone marginale	225
12.5.2	La détermination du mésoderme dorsal dans la jeune blastula résulte d'inductions provenant de l'endoderme dorso-végétatif	225
12.5.3	L'induction du mésoderme se déroule de façon progressive pendant la segmentation	226
12.5.4	Formation du centre de Nieuwkoop	228
12.5.5	Rôles du facteur de transcription VegT dans la détermination de l'endoderme et l'induction du mésoderme	229
12.5.6	La β -caténine, facteur de transcription actif dans la dorsalisation de l'embryon	231
12.5.7	Mécanismes contrôlant la concentration de la β -caténine dans l'aire dorsale. Rôle des protéines Wnt	232
12.5.8	Interventions de Vg1, de l'activine et de Nodal, en synergie avec Siamois, dans l'induction du mésoderme dorsal	234
12.5.9	Synthèse des FGF inducteurs du mésoderme ventral et latéral par les blastomères végétatifs ventraux	237
12.6	Synthèses d'ARN nouveaux, expression du génome embryonnaire	239
12.6.1	La transcription d'ARN nouveaux chez les Amphibiens est activée au moment de la transition blastuléenne	239
12.6.2	Les synthèses d'ARN sont activées dès le début de la segmentation chez les Mammifères	241
Chapitre 13 • Mouvements morphogénétiques et leur coordination		244
13.1	Modifications du cytosquelette	244
13.1.1	Pendant la formation du blastopore	244
13.1.2	Pendant la neurulation	246
13.1.3	Mécanismes intra-cellulaires qui déterminent les changements de forme	246
13.1.4	Synthèses spécifiques de protéines du cytosquelette sous l'action d'une induction	247
13.2	Cohésion cellulaire et molécules d'adhérence	247
13.2.1	Reconnaissance et adhérence sélective des cellules au cours de l'embryogenèse	247
13.2.2	Les molécules d'adhérence cellulaire	248
13.2.3	Rôle des molécules d'adhérence dans une morphogenèse	253
13.3	Communications intercellulaires et coordination des mouvements cellulaires	255
13.3.1	Description et fonctions des jonctions communicantes	255
13.3.2	Les jonctions communicantes au cours du développement	256

13.4 Migrations cellulaires et matrice extra-cellulaire	256
13.4.1 Les composants de la matrice extra-cellulaire essentiels pour la migration cellulaire	257
13.4.2 Les intégrines, récepteurs membranaires essentiels dans la relation des cellules avec la matrice extra-cellulaire	258
13.4.3 Des enzymes remanient constamment les relations entre la matrice et les cellules	260
13.4.4 Un réseau de fibronectine guide la migration des feuillettes pendant la gastrulation	261
13.4.5 Migration des cellules des crêtes neurales	262
Chapitre 14 • La mort cellulaire programmée ou apoptose	266
14.1 Contrôle génétique et déroulement d'une mort cellulaire programmée par apoptose	267
14.1.1 L'apoptose est contrôlée génétiquement	267
14.1.2 Déclenchement de la mort cellulaire	268
14.2 Quelques exemples d'apoptose au cours du développement	269
14.2.1 Disparitions et/ou remodelages de structures embryonnaires	269
14.2.2 Apoptose et métamorphose	271
Chapitre 15 • Inductions embryonnaires pendant la gastrulation et la morphogénèse	273
15.1 Le centre organisateur de Spemann et Mangold dans l'induction neurogène et mésoblastogène	274
15.1.1 Les expériences de Spemann et Mangold (1924)	275
15.1.2 Caractéristiques du centre organisateur de Spemann et Mangold	277
15.2 Transmission des informations pendant une induction	282
15.2.1 Rôle des protéines inductrices	283
15.2.2 Rôle des contacts entre tissu inducteur et tissu induit	283
15.2.3 Activation de voies de transduction par contact cellulaire	283
15.2.4 Rôle des jonctions communicantes dans la circulation des signaux d'induction	284
15.2.5 Rôle de la matrice extra-cellulaire	285
15.3 Expression des gènes régulateurs du développement pendant la gastrulation	286
15.3.1 Répartition des facteurs de transcription dans le mésoderme	286
15.3.2 Participation du gène <i>goosecoïd</i> à l'établissement de la polarité céphalique et à l'organisation du mésoderme axial	287
15.3.3 Rôle de la protéine Wnt8 dans la différenciation du mésoderme ventral	289
15.3.4 Rôle du gène <i>Brachyury</i> dans la différenciation du mésoderme	289
15.4 Sécrétion des protéines inductrices de structures dorsales par le centre organisateur de Spemann et Mangold	290
15.4.1 Les protéines Noggin, chordin et la follistatine	290

Table des matières

15.4.2	Les différenciations régionales au sein des grands axes dépendent d'autres inducteurs élaborés dans le centre organisateur de Spemann et Mangold	294
15.5	L'induction du système nerveux et de l'épiderme	296
15.5.1	Signaux neuralisants, céphaliques et postérieurs	296
15.5.2	Induction de l'épiderme et différenciation neurale	298
15.5.3	Détermination du territoire des crêtes neurales	300
15.6	Formation des somites chez les Vertébrés	300
15.6.1	Mécanismes de la somitogenèse : l'horloge de segmentation du mésoderme somitique et la voie Notch	300
15.6.2	Relations entre la gastrulation et le fonctionnement périodique de l'horloge	303
15.7	L'asymétrie droite-gauche chez les Vertébrés	305
15.7.1	L'asymétrie droite-gauche chez l'embryon du poulet	306
15.7.2	L'asymétrie droite-gauche chez les Mammifères	307
15.7.3	Symétrie ou asymétrie ? Rôle de l'acide rétinolique	309
15.8	Les inductions au cours de la différenciation de l'œil	310
15.8.1	Description sommaire de la morphogenèse de l'œil	310
15.8.2	Cette organogenèse est le résultat d'une série d'inductions	312
15.8.3	Un même gène contrôle le développement des photorécepteurs de l'œil chez toutes les espèces	314
15.8.4	Un seul gène ne suffit pas à contrôler la différenciation d'un organe	316
15.9	Conséquences des inductions	317
15.9.1	Accroissement des synthèses d'ADN	317
15.9.2	Activation de nouvelles synthèses d'ARN et de protéines	318
15.9.3	Champs morphogénétiques. Disparition des capacités de régulation	318
15.9.4	L'organogenèse s'accompagne de synthèses de protéines organo-spécifiques	320
Chapitre 16 • Expression du génome embryonnaire		324
16.1	Évolution de la population d'ARN-m de l'ovocyte aux premiers stades du développement	325
16.1.1	ARN-m traduits chez l'embryon d'oursin	325
16.1.2	ARN-m traduits chez les Vertébrés	326
16.2	Synthèses d'ARN-m nouveaux et différenciation	327
16.2.1	Mise en évidence d'ARN-m nouveaux après la mi-blastula, chez le xénope	327
16.2.2	L'activation des gènes de la myogenèse : un exemple d'activation de gènes tardifs	329
16.3	Effets régulateurs du cytoplasme sur l'expression des gènes	331
16.3.1	Recyclage d'un noyau somatique greffé par un cytoplasme ovocytaire	332
16.3.2	Cytoplasme et activation des gènes chez l'embryon	333

16.3.3	L’empreinte génomique	333
16.3.4	Échange de protéines entre noyau et cytoplasme	334
16.3.5	Étude des potentialités des noyaux des cellules somatiques par la technique des greffes nucléaires chez les Amphibiens	335
16.4	Clonage par transplantation de noyaux somatiques dans des ovocytes de Mammifères	337
16.5	Cellules souches embryonnaires	341
16.5.1	Mécanisme du maintien de l’état pluripotent indifférencié	341
16.5.2	Intérêt de l’étude des cellules souches	343
Chapitre 17 • Différenciation des gonades et différenciation sexuelle. Médiation hormonale, déterminisme génétique		346
17.1	Morphogénèse des gonades	346
17.1.1	Les crêtes génitales et le blastème gonadique, éléments somatiques de la gonade	346
17.1.2	Les cellules germinales primordiales	348
17.1.3	Migration des cellules germinales et colonisation des crêtes génitales	349
17.1.4	Formation de gonades indifférenciées	351
17.1.5	Différenciation des gonades	352
17.2	Différenciation des conduits génitaux	357
17.2.1	Différenciation des conduits urinaires	357
17.2.2	Différenciation des conduits génitaux femelles	357
17.2.3	Différenciation des conduits génitaux mâles	358
17.3	Relations entre sexe génétique et différenciation sexuelle	359
17.3.1	Détermination génétique du sexe	359
17.3.2	Formule chromosomique et différenciation des gonades	360
17.3.3	Localisation du gène de masculinisation chez les Mammifères	360
17.3.4	Rôle des cellules de Sertoli dans la différenciation du testicule	366
17.3.5	Différenciation de la gonade en ovaire	367
17.4	Les hormones dans la différenciation sexuelle des Mammifères	369
17.4.1	Activité hormonale des gonades embryonnaires	369
17.4.2	Les récepteurs à la testostérone	371
17.4.3	Différenciation mâle	372
17.4.4	Différenciation femelle	372
17.4.5	Déterminisme de la différenciation des voies génitales	373
17.4.6	Mécanisme d’extinction d’un chromosome X chez la femelle des Mammifères	376
Réponses aux questions		379
Bibliographie		397
Index		399

AVANT-PROPOS

Cet ouvrage est destiné à des étudiants en Licence et en Master de cursus biologiques ainsi qu'aux candidats aux concours de recrutement de l'enseignement secondaire et aux élèves de BCPST.

La présentation de l'ouvrage a légèrement changé par rapport à l'édition précédente. Nous avons facilité plusieurs niveaux de lecture par quelques aménagements. Pour ceux qui désirent simplement acquérir des idées générales sur des questions de biologie du développement traitées dans l'ouvrage, une lecture négligeant les textes en retrait et en petits caractères peut suffire sans nuire à la compréhension générale. Certains de ces passages donnent un aperçu des techniques utilisées dans l'acquisition des résultats décrits, d'autres apportent des précisions permettant une connaissance plus approfondie des données exposées ; ils concernent moins les étudiants de Licence. D'autre part, des encarts ont pour but de donner des informations complémentaires et d'attirer l'attention sur des définitions importantes, des hypothèses, l'historique de certaines découvertes ou le regroupement de données techniques auxquelles on se réfère couramment. Enfin, conformément aux recommandations ministérielles incitant à un développement du travail personnel, des questions de révisions destinées à des autoévaluations sont présentes à la fin de chaque chapitre et leurs réponses réunies en fin d'ouvrage. Le lecteur notera qu'elles ne constituent que des propositions d'exercices et qu'elles ne prétendent pas couvrir la totalité des sujets abordés.

Le plan de l'ouvrage n'est pas modifié par rapport aux éditions précédentes et suit un ordre chronologique permettant une présentation en boucle depuis la formation des gamètes jusqu'à l'individu en développement chez lequel est considérée l'acquisition de ses fonctions de reproduction.

La gamétogenèse et la fécondation constituent la première partie. Elle est suivie d'une présentation succincte du développement de plusieurs espèces animales modèles sous leur aspect purement descriptif. Les mécanismes de la morphogenèse sont ensuite abordés dans une optique très générale qui, tout en s'appuyant sur des exemples issus de travaux portant sur des modèles d'Invertébrés (Oursins, drosophile, etc.) et de Vertébrés (poulet, souris), s'efforce de dégager des règles générales des mécanismes de développement qui soient valables pour tous les Métazoaires.

La connaissance du contrôle génétique du développement tient une place qui ne cesse de croître, avec, comme conséquence pour l'étudiant, la découverte d'un inévitable cortège de molécules nouvelles... S'il n'en connaît pas nécessairement la liste qui ne cesse de s'allonger, il aura au moins saisi la vitalité de la discipline qu'il étudie !

Segmentation, mouvements morphogénétiques, inductions embryonnaires forment une succession d'événements qui obéissent au fonctionnement quasi semblable de gènes organisateurs et régulateurs hautement conservés au cours de l'évolution ; leur

connaissance a d'ailleurs été acquise grâce à la drosophile, si éloignée des Vertébrés. Les étapes du développement sont sous la dépendance de ces gènes, qui s'expriment tout d'abord à partir du génome maternel, et qui sont relayés ensuite, plus ou moins rapidement selon les espèces, par ceux du génome embryonnaire. À ces connaissances acquises depuis plusieurs années déjà, nous avons apporté une attention plus précise à la fin de cet ouvrage, au cas de l'empreinte génomique. Ce mécanisme, bien étudié chez les Mammifères, montre que dans un génome diploïde, l'origine paternelle ou maternelle d'un gène activé pour certaines fonctions n'est pas indifférente. Un programme épigénétique tel que celui de méthylations sélectives décide du gène paternel ou maternel qui sera inactivé et toute erreur peut être tératogène ou létale.

L'embryogenèse d'un organisme résulte d'une association complexe d'événements qui affectent la vie cellulaire et qui s'expriment en termes de prolifération, différenciation mais également de mortalité programmée, l'apoptose. Aussi surprenant que cela paraisse, cette dernière s'avère indispensable lors d'étapes critiques du développement comme peut l'être une métamorphose ou une organogenèse nécessitant un modelage harmonieux de certaines parties corporelles. La brièveté du chapitre qui lui est consacré ne doit pas faire négliger l'importance de ce concept relativement récent.

Nous décrivions dans l'édition précédente les mécanismes qui gouvernent l'asymétrie du développement de différentes parties d'un organisme, mais rien ne permettait d'expliquer les raisons pour lesquelles d'autres parties échappaient à cette asymétrie. En prenant pour exemple la somitogenèse, un élément de réponse est évoqué avec la mise en évidence du rôle correcteur de l'acide rétinoïque, une molécule active dans bien des étapes du développement.

Les travaux de clonage avaient démontré qu'un noyau somatique conservait toutes ses potentialités génomiques. On montre maintenant que des cellules différenciées peuvent aussi retrouver des potentialités qu'on pensait perdues. L'expression du génome embryonnaire et le cheminement des cellules pluripotentes dans des voies de différenciations spécialisées se sont en effet révélés réversibles. Nous avons abordé ces questions dans des éditions précédentes, mais les progrès réalisés dans l'obtention et dans l'emploi de ce matériel nous ont conduits à les développer.

Les mécanismes de la différenciation sexuelle s'appuient le plus souvent sur des exemples pris chez les Vertébrés. Il s'agit d'un domaine qui nécessiterait un ouvrage entier tant est grande la diversité des solutions adoptées dans le règne animal. Nous nous sommes limités à ajouter quelques brèves données sur la drosophile et, chez les Vertébrés, sur le rôle de facteurs externes dans la détermination phénotypique du sexe. C'est ici également que nous avons cru utile d'apporter quelques explications sur les fonctionnements des gènes portés par les chromosomes X des Mammifères. Le mâle étant haploïde pour le X, et la femelle diploïde, comment peut-on néanmoins rendre compte d'une égalité entre les sexes ?...

*Avertissement concernant la nomenclature
utilisée dans le texte à propos des gènes et de leurs produits :*

- Le nom générique d'une famille de gènes (ex : Hox, Pax...) est écrit en caractères normaux cependant que la désignation d'un gène donné est en italique (ex : *Hox B-6*, *Pax7*....),
- Les gènes humains sont conventionnellement écrits en majuscules (ex : *PAX6*, *SRY*...) à la différence des gènes des autres espèces animales écrits en minuscules (ex : *Pax6*, *sry*...),
- Les produits des gènes sont systématiquement écrits avec une majuscule et en caractère normal (ex : la protéine Bicoïd codée par le gène *bicoïd*),
- La présence d'une majuscule à un nom de gène signifie le caractère dominant de ce dernier (ex : *Krüppel*).
- Les ARN-m sont indifféremment désignés sous deux formes (ex : l'ARN-m *bicoïd* ou l'ARN-m de Bicoïd).

PARTIE 1

GAMÉTOGENÈSE ET FÉCONDATION

Chez les Métazoaires, la forme la plus typique de développement est celle qu'on observe dans la reproduction sexuée. Des cellules reproductrices haploïdes se différencient : les spermatozoïdes et les ovules. À la fécondation, elles fusionnent et forment un œuf ou zygote diploïde qui pourra se développer en un nouvel individu.

L'ovogenèse est étudiée ici de façon assez détaillée. C'est en effet pendant cette période que sont transcrits les premiers gènes qui contrôleront le plan d'organisation du futur organisme.

GÉNÉRALITÉS SUR LA GAMÉTOGÈSE – LA MÉIOSE

1

PLAN

- 1.1 Comparaison entre la spermatogenèse et l'ovogenèse
- 1.2 Déroulement de la méiose

La différenciation des cellules reproductrices ou **gamètes** est la **gamétogenèse**. Les gamètes mâles sont les **spermatozoïdes**, les gamètes femelles sont les **ovules**. Leur formation, **spermatogenèse** ou **ovogenèse** a lieu dans des organes spécialisés, les gonades : **testicules** ou **ovaires**. Celles-ci peuvent avoir en outre un rôle de glandes endocrines d'où leur appellation de glandes génitales, c'est le cas des Vertébrés.

La spermatogenèse et l'ovogenèse se déroulent chez des individus différents dans les espèces dites **gonochoriques**. C'est la règle chez les Vertébrés (avec un certain nombre d'exceptions, chez des Poissons par exemple).

L'expression phénotypique du sexe est, le plus souvent, déterminée génétiquement dès la fécondation par l'existence de gènes spécifiques portés par des chromosomes dits sexuels symbolisés par X et Y ou Z et W, selon les espèces. L'un des sexes est homogamétique et ne forme qu'une catégorie de gamètes : c'est la femelle (XX) chez les Mammifères, le mâle (ZZ) chez les Oiseaux. L'autre sexe est hétérogamétique (XY ou ZW) et forme deux catégories de gamètes qui diffèrent par la nature du chromosome sexuel. Les apports combinés des chromosomes contenus dans les gamètes forment des œufs à potentialité de développement mâle ou femelle. Ce déterminisme génétique du sexe peut-être modifié par certains facteurs, telle la température. C'est le cas chez de nombreux Reptiles par exemple (voir § 17.3.2).

Les espèces chez lesquelles un même individu est porteur de gonades mâles et femelles sont dites **hermaphrodites**. Les exemples sont fréquents chez les Invertébrés (Vers, Mollusques, etc.) mais se rencontrent également chez des Vertébrés (certains Poissons). Dans le cas d'**hermaphrodisme simultané**, un même individu possède soit en même temps des gonades distinctes, mâles et femelles (ver de terre) soit un organe unique, à la fois mâle et femelle, désigné sous le terme d'**ovotestis** (Gastéropodes Pulmonés). Une fécondation croisée entre partenaires a néanmoins lieu à quelques rares exceptions près (cas d'autofécondation). Dans le cas d'**hermaphrodisme successif**, l'animal présente à des moments différents de son cycle vital, une activité sexuelle mâle puis femelle (**hermaphrodisme protandre**) ou, plus rarement l'inverse (**hermaphrodisme protogyne**).

La différenciation des gamètes présente une assez grande uniformité de caractères dans tout le règne animal.

1.1 COMPARAISON ENTRE LA SPERMATOGENÈSE ET L'OVOGENÈSE (fig 1.1)

1.1.1 Ressemblances

La gamétogenèse commence par une **phase de multiplication**, pendant laquelle les cellules germinales diploïdes (**spermatogonies** ou **ovogonies**) se divisent par mitoses puis les divisions cessent. Pendant la préprophase de méiose, les cellules germinales dupliquent leur ADN, deviennent des **spermatocytes I** ou des **ovocytes I** (parfois désignés sous le terme général d'**auxocytes I**) qui augmentent de volume par accroissement de leur cytoplasme et entrent en prophase de la première division de méiose. C'est la **phase d'accroissement**. Les processus mêmes de la méiose sont identiques dans la spermatogenèse et l'ovogenèse. Ils seront étudiés dans un paragraphe suivant.

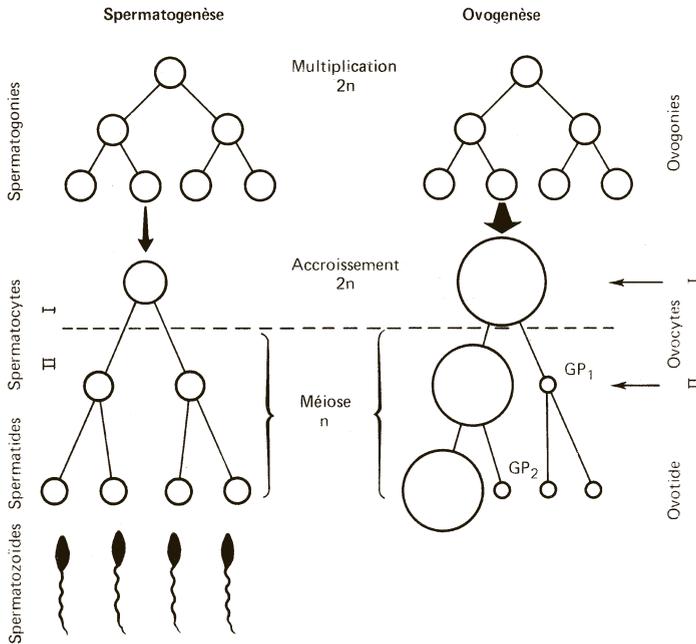


Figure 1.1 - Schéma comparatif de la spermatogenèse et de l'ovogenèse.

1.1.2 Différences

a) Durée du cycle

Le temps nécessaire à la transformation d'une gonie en gamète mûr constitue un cycle. La spermatogenèse est de plus courte durée que l'ovogenèse. Cette différence est plus marquée chez les Vertébrés supérieurs : un cycle ovogénétique peut s'étendre sur toute la vie sexuelle de la femelle, un cycle spermatogénétique ne dure que quelques semaines.

b) Localisation temporelle de la période de multiplication

Chez le mâle, elle dure depuis la maturité sexuelle jusqu'à la sénescence. Chez les femelles de Vertébrés inférieurs ou anamniotes (Poissons Téléostéens et Amphibiens) il existe une vague de mitoses qui suit une période de ponte, et dont les produits sont à l'origine de la ponte suivante. Chez les Vertébrés supérieurs ou amniotes (Reptiles, Oiseaux, Mammifères), les ovogonies cessent de se multiplier très tôt, pendant la vie fœtale ou périnatale de la jeune femelle. La croissance et la maturation des ovocytes concernent des lots limités d'ovocytes au cours de cycles qui se succèdent à partir de la maturité sexuelle et durent toute la vie sexuelle.

c) Importance de la période d'accroissement

Le volume des spermatocytes I augmente peu par rapport à celui des spermatogonies. L'accroissement des ovocytes I qui accumulent des réserves parfois très importantes (*cf.* le jaune de l'œuf d'Oiseau) est considérable ; il est de plus longue durée que pour les spermatocytes.

d) Place de la méiose dans le cycle

Toutes les synthèses qui caractérisent la différenciation biochimique de l'ovocyte ont lieu dans la cellule à l'état diploïde, avant l'achèvement de la première division de méiose. Dans la lignée mâle, après une phase de synthèse dans les spermatocytes I, les deux divisions de méiose précèdent la différenciation morphologique en spermatozoïdes (ou **spermiogenèse**).

e) Résultats de la méiose

Après la méiose, un spermatocyte I donne naissance à 4 spermatozoïdes morphologiquement identiques et fonctionnels. Les ovocytes I et II subissent des divisions très inégales quant au partage du cytoplasme entre les cellules filles. À l'achèvement de la méiose, une seule d'entre elles conserve toutes les réserves cytoplasmiques et sera fonctionnelle, les autres sont les globules polaires.

1.2 DÉROULEMENT DE LA MÉIOSE (fig 1.2)

Elle sera décrite assez brièvement, son mécanisme et ses conséquences étant largement développés dans les ouvrages de biologie cellulaire ou de génétique.

Une gonie qui a cessé de se multiplier devient un auxocyte I et l'ADN chromosomique se duplique pendant la « préprophase » de méiose (stade **préleptotène**). Les deux divisions cellulaires qui, sans duplication intermédiaire des chromosomes, succèdent à cette phase, constituent la méiose.

Les **auxocytes I** sont les cellules qui entrent en prophase de la première division. Ils se divisent une première fois, séparant les chromosomes formant une paire d'homologues. Les cellules filles sont des **auxocytes II** avec un nombre haploïde de chromosomes. En réalité, l'ADN de chaque chromosome est déjà dupliqué, depuis la « préprophase », mais les deux chromatides résultant de cette duplication ne se

Partie 1 • Gamétogenèse et fécondation

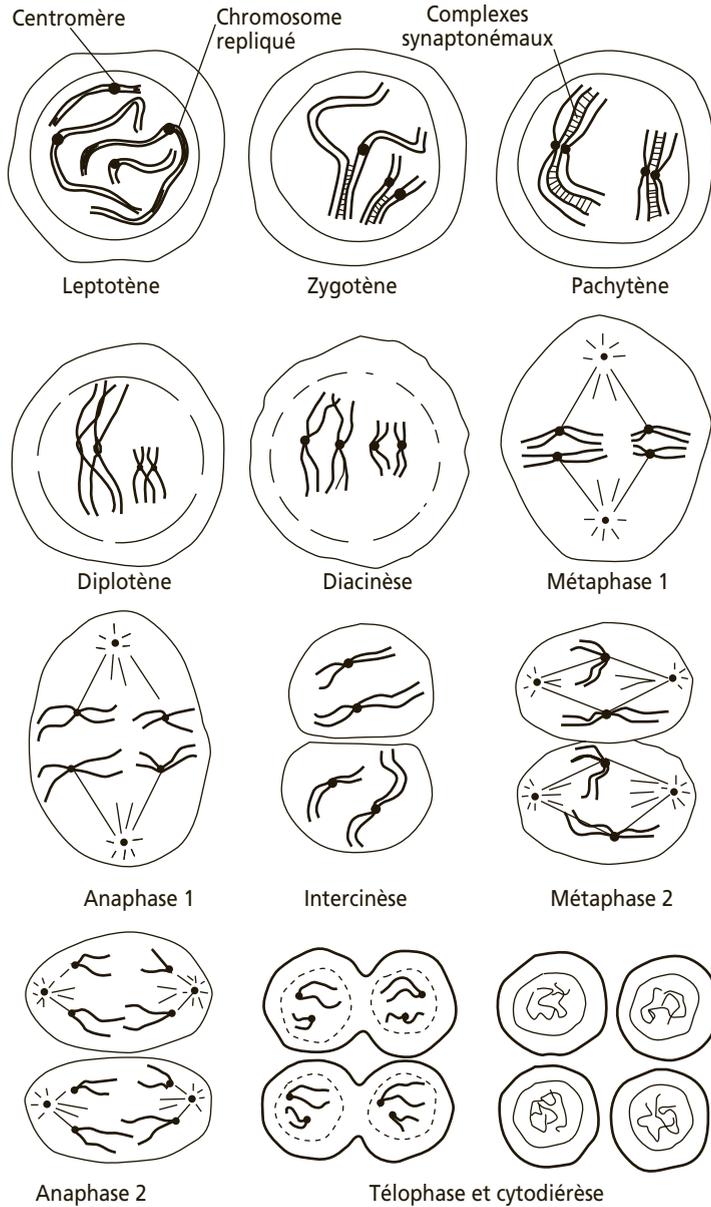


Figure 1.2 - Schéma de la méiose dans une cellule où le nombre haploïde de chromosomes est égal à 2.

sont pas séparées, car dans cette division particulière les centromères ne se clivent pas. Les auxocytes II vont ensuite se diviser suivant une mitose normale, avec division des centromères, mais il n'y a pas de phase S préliminaire. Les quatre cellules formées auront un nombre haploïde de chromosomes, avec un seul chromosome de chaque paire formé d'une seule chromatide.

1.2.1 Synthèses d'ADN pendant le stade préleptotène

Après la dernière division des **gonies** et après une phase G1 courte¹, la duplication de l'ADN (phase S) est mise en évidence pendant le stade préleptotène, par incorporation de thymidine tritiée². Elle précède l'accroissement de taille des auxocytes I. Cette duplication est plus lente que celle qui précède une mitose ordinaire. On a montré chez les Amphibiens que le nombre de points d'initiation de la synthèse d'ADN est plus réduit que pour une mitose.

1.2.2 Prophase de la première division de méiose

C'est au cours de la prophase de méiose que se réalisent les recombinaisons génétiques et qu'ont lieu les synthèses d'ARN stables nécessaires à la formation des gamètes. Elle peut être de très longue durée dans certaines ovogenèses. On distingue cinq stades :

a) Le stade leptotène

Les chromosomes extrêmement déspiralisés pendant l'interphase commencent à se spiraler; chaque chromosome est déjà dupliqué, mais les deux chromosomes fils ou chromatides restent reliés par leur centromère. Les chromosomes homologues tendent à se rejoindre, suivant un mécanisme qui n'est pas connu.

b) Le stade zygotène

Un appariement progressif des chromosomes homologues désigné sous le terme de **synapsis** se produit. Il s'accompagne de la mise en place de **complexes synaptonémaux**. Ces derniers apparaissent en microscopie électronique sous l'aspect de trois bandes parallèles et de nombreuses fibres transversales reliant la bande centrale aux bandes latérales. Ces structures de nature protéique résistent à l'action de la DNase et contribuent à maintenir les chromosomes s'appariant en contact étroit. Chaque paire de chromosomes appariés forme un **bivalent**.

c) Le stade pachytène

L'appariement des chromosomes homologues est achevé. La spiralisation des chromatides s'accroît et les chromosomes sont mieux individualisés. Les deux chromatides de chaque chromosome deviennent visibles et les bivalents sont désignés sous le terme de **tétrades**.

1. Au cours du cycle mitotique, on distingue après la fin d'une mitose (phase M), pendant l'interphase, une phase G1 (de l'anglais «gap») sans duplication d'ADN, une phase S correspondant à la synthèse ou duplication de l'ADN, une phase G2 pendant laquelle la duplication de l'ADN est achevée, et qui précède la mitose suivante.

2. Le tritium représenté par ³H est un hydrogène radioactif qui, lorsqu'il est incorporé dans une molécule de précurseur (nucléotide, acide aminé, etc.), permet de la repérer au cours des processus métaboliques cellulaires et d'analyser ceux-ci qualitativement et quantitativement.

Partie 1 • Gamétogenèse et fécondation

C'est pendant ce stade qu'apparaissent des « **crossing-over** », c'est-à-dire des échanges de segments entre chromatides de chromosomes homologues d'origine paternelle et maternelle.

Dans les conditions normales, ce sont des fragments homologues qui sont échangés. Il en résulte des recombinaisons génétiques, une même chromatide recombinée pouvant porter alors des gènes d'origine paternelle et d'origine maternelle. Des anomalies d'échanges sont possibles, entraînant dans l'une des chromatides des **délétions** (perte d'un fragment), dans l'autre des **duplications** (fragment en double exemplaire). Une faible synthèse d'ADN est encore décelable au zygotène et au pachytène. Il pourrait s'agir de réparation de chromosomes brisés dans les « crossing-over ». L'inhibition de ces synthèses tardives provoque en effet des anomalies de la méiose : absence de complexes, fragmentation des chromosomes.

d) Le stade diplotène

L'appariement étroit entre les chromosomes homologues ne subsiste qu'en des points spécifiques ou **chiasma**, les chromatides homologues s'écartant l'une de l'autre entre ces points.

Ces chiasma¹ sont les manifestations morphologiques des « crossing-over » qui se sont produits au stade pachytène. Dans les ovocytes, les chromosomes présentent souvent une structure particulière dite en « **lampbrush** » ou en **écouvillon** ; c'est une période de synthèse intense d'ARN. Cette synthèse sera plus spécifiquement étudiée à propos de l'ovogenèse (voir chap. 3) durant laquelle elle est particulièrement longue. Chez les Mammifères, dans les jeunes ovocytes, on parle de stade **dictyotène** lorsque ces chromosomes ne sont pas le site de synthèses d'ARN.

e) Le stade diacinèse

La condensation atteinte par les chromosomes est maximale. Les bivalents ne restent unis que par les chiasma. Ces points d'entrelacement local entre chromatides paraissent s'être progressivement déplacés depuis le diplotène vers les extrémités des chromosomes (**terminalisation des chiasma**). Ce mouvement apparent est dû au raccourcissement des chromosomes en raison de leur extrême spiralisation.

1.2.3 Fin de la première division

Le nucléole et la membrane nucléaire disparaissent, les tétrades se disposent de telle manière que les centromères des paires de chromosomes homologues soient symétriques de part et d'autre de la plaque métaphasique. À l'**anaphase**, les chromosomes homologues se séparent et migrent vers les pôles. Leur ségrégation au hasard dans les cellules filles est un facteur de recombinaisons des gènes d'origine paternelle et maternelle. Il s'y ajoute les recombinaisons dues aux « crossing-over ». En négligeant les « crossing-over », le nombre de recombinaisons possibles si $n = 23$ (chez l'homme) est de 2^{23} , soit une possibilité de 10 millions de gamètes

1. Le pluriel correct, chiasmata, s'emploie peu.

différents chez un même individu ; l'existence des « crossing-over » augmente ces combinaisons à l'infini. Après la **télophase** se forment les spermatocytes II ou les ovocytes II.

1.2.4 Seconde division de méiose

Elle survient sans phase S intermédiaire. Les chromatides se séparent à l'anaphase II par scission du centromère. Copies identiques, à l'origine, elles sont différentes à la suite des recombinaisons dues aux « crossing-over » entre les chromatides des chromosomes homologues.

Questions

- 1.1 Quels sont les événements principaux qui différencient la 1^{re} division de méiose d'une division mitotique normale ?
- 1.2 À quels phénomènes de la méiose peut-on rattacher l'importance de celle-ci dans le maintien de la diversité génétique ?
- 1.3 Citer dans l'ordre les différentes étapes de la prophase de division I de méiose
- 1.4 À quoi correspond un cycle vital d'un Métazoaire ?
- 1.5 Comment les phases haploïde et diploïde se répartissent-elles chez les Métazoaires ?
- 1.6 La genèse d'un individu nécessite-t-elle toujours l'existence de gamètes ?
- 1.7 Qu'appelle-t-on ovotestis ?

Réponses page 379

2

SPERMATOGENÈSE

PLAN

- 2.1 Structure d'un testicule de Mammifère
- 2.2 Les cellules germinales
- 2.3 La spermiogenèse
- 2.4 Morphologie et biologie des spermatozoïdes mûrs
- 2.5 Les hormones sexuelles et le contrôle de la gamétogenèse

La différenciation spermatogénétique a été décrite pour la première fois dans le testicule d'un ascaris (Ver Nématode parasite) par Hertwig (1880)¹. Chez cette espèce, les gonades sont filiformes et les différentes séquences se présentent suivant un ordre linéaire, ce qui en avait fait un matériel de choix pour l'étude de la spermatogenèse. Elle est étudiée ici d'après des exemples choisis parmi les Vertébrés et plus particulièrement les Mammifères.

2.1 STRUCTURE D'UN TESTICULE DE MAMMIFÈRE (fig 2.1)

(La différenciation d'un testicule est étudiée dans le chapitre 17).

2.1.1 Organisation générale

Chez les Vertébrés supérieurs, les tissus séminifères sont organisés en **tubules** ou **tubes séminifères**. Chez les Mammifères, ces tubules convergent vers le **hile** du testicule et entrent en relation avec les **canalicules évacuateurs** ou **tubes droits** anastomosés dans le « **rete testis** » ; ils se prolongent par les **canaux efférents**, l'**épididyme** et le **canal déférent** ou **canal de Wolff** qui aboutit au sommet de l'urètre. Entre les tubes séminifères se trouve du tissu conjonctif, le **tissu interstitiel**. Un tissu conjonctif fibreux, l'**albuginée**, forme une gaine protectrice autour du testicule ; elle est doublée intérieurement d'une tunique très vascularisée et contient des fibres musculaires lisses; elle peut, chez certaines espèces (ex.: l'homme) émettre des cloisons qui divisent les testicules en lobules. Le testicule est limité par un épithélium.

2.1.2 Structure du tissu interstitiel

C'est un tissu conjonctif qui est très vascularisé. Il contient en permanence des **cellules de Leydig** regroupées en amas qui produisent 95 % de la testostérone dosée dans le sang. Ce sont de grosses cellules polygonales dont le réticulum endoplasmique

1. On notera que l'indication de noms de chercheurs suivis d'une date, sans indications bibliographiques, est uniquement destinée à fournir une chronologie de l'évolution des connaissances.

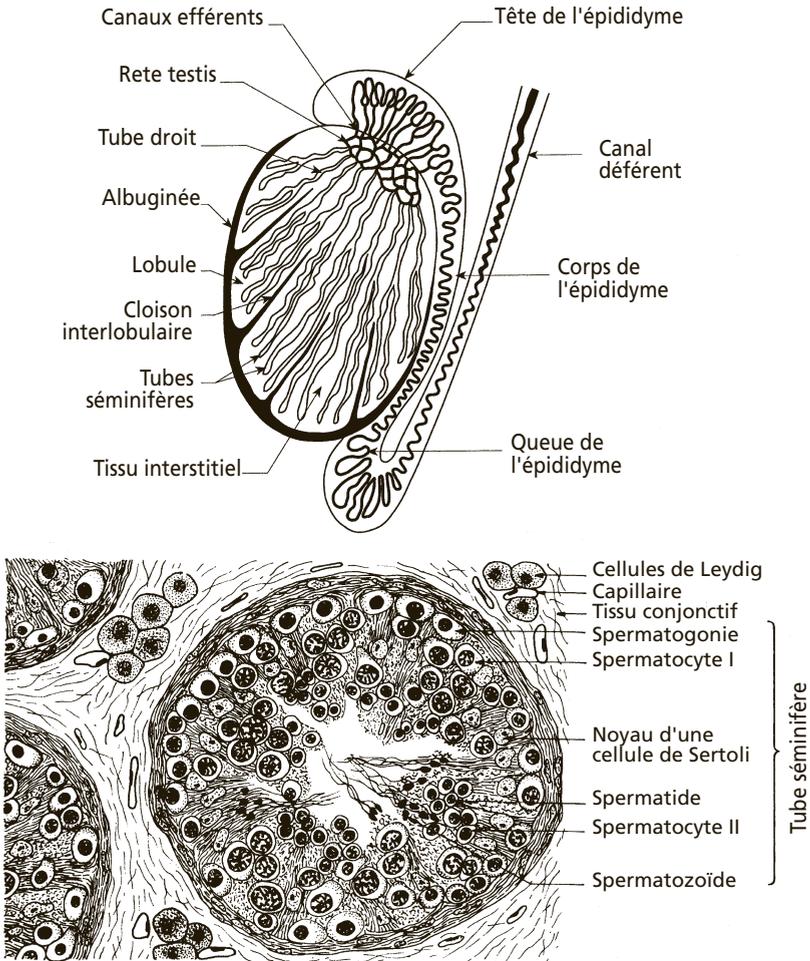


Figure 2.1 - Schéma d'un testicule de Mammifère et coupe histologique montrant l'organisation des tubes séminifères et du tissu interstitiel.

que lisse et les enclaves lipidiques propres aux cellules sécrétrices de stéroïdes sont très développés. Leur activité sécrétoire est synchronisée et peut être saisonnière chez certaines espèces.

2.1.3 Structure d'un tube séminifère (fig 2.2)

Ces tubes dérivent des cordons séminifères pleins du testicule fœtal. Ils débouchent dans les **tubes droits** qui sont limités par un épithélium simple. Leur paroi est formée par un épithélium pluristratifié comprenant deux types de cellules : des cellules germinales, les **cellules de la lignée spermatique**, à renouvellement continu, évoluant en spermatozoïdes qui sont libérés dans la lumière du tubule et des cellules somatiques, les **cellules de Sertoli**. À leur périphérie, les tubules sont isolés du tissu inters-

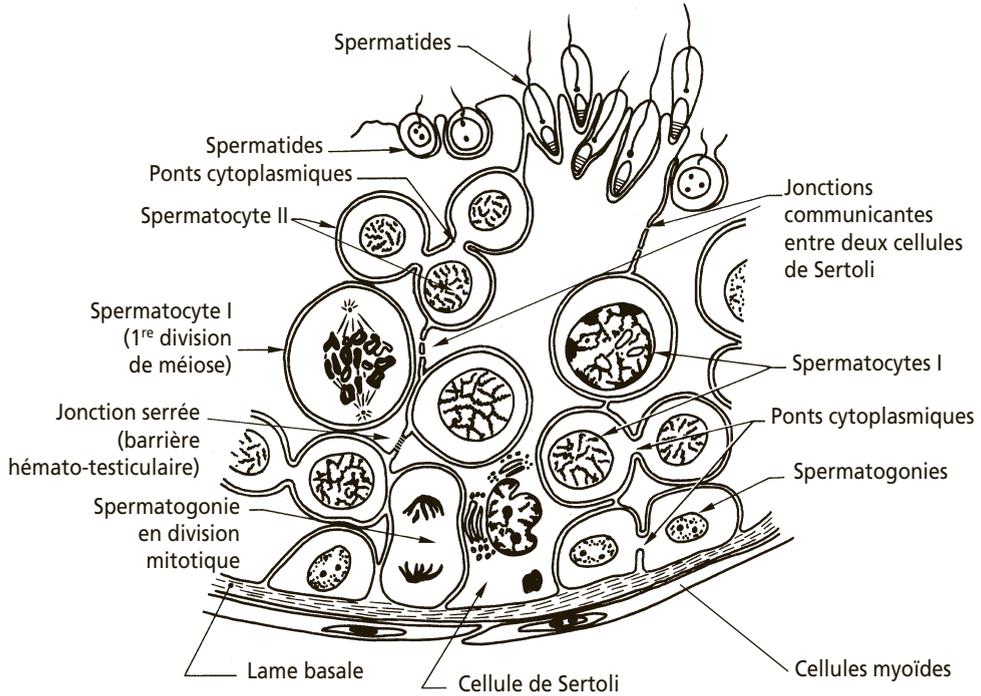


Figure 2.2 - Schéma de la paroi d'un tube séminifère de Mammifère.

Toutes les cellules sexuelles sont étroitement enserrées par les cellules de Sertoli qui ont entre elles des jonctions serrées et communicantes. Ces contacts durent jusqu'à la fin de la spermiogenèse avec des spermatides implantées dans l'apex des cellules de Sertoli. Les cellules germinales issues d'une même spermatogonie sont reliées par des ponts cytoplasmiques jusqu'au début de la spermiogenèse.

titiel par une tunique comprenant la lame basale, une ou plusieurs couches de cellules myofibroblastiques (**cellules myoïdes**) qui se contractent rythmiquement, et un tissu fibreux constitué notamment de collagène.

a) Les cellules de Sertoli

Ce sont des cellules somatiques columellaires qui reposent sur la lame basale qui entoure le tube. Leur forme et leur fonction évoluent considérablement entre la vie fœtale et la puberté ; elles se multiplient jusqu'à la période pubertaire, leur nombre reste ensuite fixe chez l'adulte. Dans le testicule adulte, leur cytoplasme est abondant et possède des ramifications qui entourent les cellules germinales. Étroitement reliées entre elles par des jonctions serrées particulières, elles forment une barrière étanche dite **barrière hémato-testiculaire**. Celle-ci divise le tubule séminifère en deux compartiments, l'un basal, contenant les spermatogonies et les spermatocytes I en préméiose (stade préleptotène), et un autre, adluminal, comportant les cellules en méiose et en cours de différenciation terminale. Cette barrière permet à ce dernier compartiment d'isoler du milieu intérieur les cellules engagées dans le

processus de la spermatogenèse et de les protéger du système immunitaire. En cas de perméabilité accidentelle, il y a attaque des cellules germinales par ce système et apparition de pathologies (par exemple immunodestruction des gonies à la suite d'oreillons chez l'adulte).

À l'extrémité distale de la cellule de Sertoli qui atteint la lumière du tube, sont implantées des spermatides qui achèvent leur maturation; on en trouve une dizaine à l'apex d'une même cellule chez le rat. Le réticulum endoplasmique granulaire et l'appareil de Golgi des cellules de Sertoli sont peu développés. Le réticulum lisse abondant est accompagné d'inclusions lipidiques. Le cytoplasme contient aussi du glycogène et des lysosomes. Le noyau lobulé, situé en position basale, est volumineux, avec une chromatine diffuse et un gros nucléole indiquant une activité élevée de synthèse d'ARN.

Des variations morphologiques s'observent en fonction du cycle spermatogénétique, variations du volume et des ramifications qui atteignent leur minimum après la **spermiation** (voir § 2.3.1c). Par ailleurs, le nombre de cellules de Sertoli mises en place durant la vie fœtale conditionne le nombre de cellules germinales présentes dans le testicule.

Outre leur rôle de soutien dans la structure du tubule séminifère, les cellules de Sertoli exercent de manière directe ou non, un contrôle étroit de la spermatogenèse. Soumises à divers stimuli hormonaux (voir § 2.5.2b) et à des facteurs paracrines locaux, ces cellules régulent leur propre activité mais également celles des cellules voisines (cellules germinales) et des cellules de Leydig en produisant près d'une soixantaine de molécules.



Parmi les produits synthétisés, on distingue des **facteurs de croissance** (TGF β , EGF, IGF, GDNF), des **cytokines** (interleukines IL-1, IL-6), des **protéines de transport** pour des métabolites ou des hormones (transferrine, protéine de liaison de la testostérone ABP pour « Androgen Binding Protein »,...), des **protéases** qui en modifiant la matrice extracellulaire, permettent la progression des cellules germinales vers la lumière du tubule, des enzymes nécessaires à la résorption des corps cytoplasmiques résiduels éliminés après la maturation des spermatozoïdes et à celle de certaines cellules germinales qui dégèrent (voir § 2.3.1c), des **métabolites énergétiques** tel le lactate utilisé comme source d'énergie par les cellules germinales, des **hormones** apparentées au TGF- β^1 comme l'**hormone anti-müllérienne (AMH)** synthétisée dans le testicule fœtal et qui détermine la dégénérescence du canal de Müller (voir § 17.4.5d) ou bien encore les **inhibines** et **activines**, ces dernières pouvant également se comporter en **facteurs paracrines**.

b) Les cellules germinales

Dans la paroi des tubes séminifères, on observe la présence constante de cellules germinales à toutes les étapes de leur différenciation. Ce sont, distribués progressi-

1. Les facteurs de croissance transformants β ou TGF- β (pour « Transforming Growth Factor- β ») forment une famille de médiateurs à laquelle se rattachent diverses molécules, en particulier l'activine, qui joue aussi un rôle important dans les processus d'induction du mésoderme (voir § 11.1.2a).

vement depuis la lame basale jusqu'à la lumière du tube, les spermatogonies, spermatocytes I, spermatocytes II, spermatides et les spermatozoïdes. Leur disposition résulte de la succession de vagues de mitoses affectant les spermatogonies à des rythmes réguliers. Les spermatogonies filles se différencient ensuite suivant une chronologie très précise au cours du **cycle spermatogénétique**.

Les spermatogonies se divisent dès la vie fœtale. Le rythme des divisions s'amplifie à partir de la puberté et certaines d'entre elles se différencient alors en spermatocytes. Les divisions se poursuivent pendant toute la vie sexuelle.

• *Cycle spermatogénétique*

Un cycle est la durée de l'évolution de la spermatogonie en spermatozoïde mûr. On peut apprécier expérimentalement la durée d'un cycle, en pratiquant de brèves incorporations de thymidine ^3H échelonnées dans le temps suivies d'autoradiographies, ou en réalisant des irradiations ménagées aux rayons X. Concernant cette dernière approche, on a constaté que les cellules sont d'autant plus sensibles qu'elles sont moins différenciées. Ainsi, lorsqu'on irradie un testicule avec une dose de rayonnement suffisamment faible, on ne détruit que les spermatogonies qui se divisent encore, les stades ultérieurs sont épargnés. Le délai nécessaire pour que les spermatozoïdes commencent à manquer dans le liquide séminal est le temps qui aurait été nécessaire aux spermatogonies détruites pour se transformer en spermatozoïdes. C'est donc la durée d'un cycle.

Les cycles ainsi mesurés varient suivant les espèces et leur durée constitue une constante biologique pour chacune d'elles : 12 à 15 jours chez les Oiseaux, 35 jours chez la souris et 74 jours chez l'homme. À l'intérieur d'un cycle complet, chaque stade possède une durée très variable (par exemple 23 jours pour les spermatocytes I, mais 1 jour seulement pour les spermatocytes II chez l'homme).

• *Vagues spermatogénétiques*

A tous les niveaux du tube séminifère, des spermatogonies souches entrent périodiquement en spermatogenèse donnant naissance à une nouvelle génération de cellules germinales qui évoluent de façon synchrone, ceci avant que les cellules de la génération précédente soient devenues des spermatozoïdes mûrs. Les vagues mitotiques auxquelles les spermatogonies sont soumises se succèdent chez l'homme par exemple, en un segment donné du tube séminifère, tous les 16 jours (tous les 8,8 jours chez la souris). Ainsi, pendant que se termine la différenciation des spermatozoïdes au cours d'un cycle de 74 jours, 5 autres cycles ont pu prendre leur départ sur une même zone de l'épithélium germinal, ce qui explique les superpositions, en une même aire, de cellules germinales à des stades de maturation différents.

Pour une espèce donnée, ces générations successives de cellules germinales forment un nombre limité d'associations de composition constante (6 par exemple chez l'homme). Ces associations sont fonction du temps écoulé depuis la dernière vague de mitoses et de la durée relative de chacune des différentes phases du cycle. Elles se répètent à des distances régulières tout le long du tube séminifère.

2.2 LES CELLULES GERMINALES

2.2.1 Les spermatogonies

Elles se divisent pendant toute la vie sexuelle. Parmi les cellules filles, certaines évoluent en spermatozoïdes, d'autres contribuent à maintenir la réserve de cellules souches.

Ainsi, à la base d'un tube, on distingue plusieurs types de spermatogonies d'après la répartition de la chromatine : les spermatogonies souches avec une forte proportion d'hétérochromatine, et les spermatogonies engagées dans la spermatogenèse avec une chromatine diffuse. Les secondes proviennent de la prolifération des premières suivant une programmation très précise pour chaque espèce. Chez le rat, par exemple, après deux divisions mitotiques, parmi les 4 cellules obtenues, 1 redeviendra une cellule dormante avec une chromatine dense ; elle ne se divisera à nouveau qu'au début du cycle suivant. Les trois autres cellules se multiplient encore 3 fois jusqu'à former 24 spermatogonies dont la taille est très réduite car, après chaque mitose, le volume cellulaire n'est pas intégralement restauré. Ces cellules filles restent reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques, sont riches en ribosomes et possèdent une chromatine diffuse. Elles synthétisent activement des ARN.



Chez l'homme, les cellules souches de réserve sont plaquées contre la lame basale du tubule et constituent les spermatogonies Ad à forte teneur en hétérochromatine (d pour « dense » ou « dark »). Par division, elles donnent naissance à des spermatogonies Ap (p pour « pale ») et/ou des spermatogonies Ad. Les spermatogonies Ap prolifèrent un nombre limité de fois et donnent des cellules de transit engagées dans la différenciation spermatogénétique. Chacune de celles-ci donne deux spermatogonies B qui en se divisant seront à l'origine des spermatocytes I.

2.2.2 Les spermatocytes

a) Description

La transition spermatogonie/spermatocyte est attribuée à des variations de taux de **GDNF** (pour « **G**lial **c**ell **l**ine-**D**erived **N**eurotrophic **F**actor ») sécrété par les cellules de Sertoli sous l'influence de FSH (voir § 2.5.2b).

Après la dernière division mitotique, l'ADN est dupliqué pendant le stade préleptotène, les cellules germinales deviennent des **spermatocytes I** qui sont en prophase de méiose. Par le jeu d'une dissociation transitoire des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli, elles passent alors du compartiment externe (basal) dans le compartiment central (adluminal) du tube séminifère isolé du milieu intérieur. Pendant les phases pachytène et diplotène, la chromatine apparaît fortement déspiralisée. Les nucléoles sont volumineux. La taille des cellules augmente. Après la première division de méiose, les 2 **spermatocytes II**, haploïdes, de taille deux fois plus réduite, se divisent rapidement en 4 **spermatides**.

Jusqu'à un stade avancé, les spermatocytes et les spermatides issus d'une même spermatogonie restent reliés par des ponts cytoplasmiques. Les cellules de Sertoli

possèdent aussi des contacts étroits avec la lignée germinale sous forme de jonctions communicantes¹. Ces contacts jouent certainement un rôle dans le synchronisme de la différenciation des gamètes et dans les échanges d'informations intercellulaires.

b) Les synthèses préméiotiques et postméiotiques

Pendant la croissance des spermatocytes I, des synthèses d'ARN sont aisément décelées par incorporation d'uridine ³H et histo-autoradiographie. On n'en observe pas au niveau des chromosomes sexuels qui restent hétéropycnotiques (chromatine condensée). Beaucoup d'ARN-m sont transcrits pendant le stade diplotène et ne sont traduits que durant la différenciation des spermatides. Les protéines correspondantes sont notamment nécessaires pour assurer aux spermatozoïdes leur mobilité et leur fixation aux ovules.

Des synthèses d'ARN-m subsistent après la méiose, dans les spermatocytes II et les spermatides. C'est par exemple le cas des ARN-m de tubuline, des ARN de nombreuses protéines de la membrane spermatique et des ARN des protamines. Ils ne seront traduits que pendant la spermiogenèse, c'est-à-dire lors de la différenciation des spermatides en spermatozoïdes. Chez un mâle hétérozygote pour un des gènes concernés, ce fonctionnement d'un génome à l'état haploïde peut entraîner des différences entre spermatozoïdes, notamment dans l'aptitude à la fécondation, en fonction du patrimoine génétique qui leur est échu.



On a montré qu'une mutation « t » portée par le chromosome 17 de la souris était transmise à la descendance par le mâle hétérozygote dans 99 % des cas ; les spermatozoïdes présentent une plus grande aptitude à féconder un ovule lorsqu'ils portent ce gène muté. L'expression de cette mutation doit probablement s'effectuer après la méiose et conférer alors un avantage aux spermatozoïdes porteurs de la mutation. Un mécanisme analogue permet sans doute aussi d'éliminer des spermatozoïdes porteurs de mutations défavorables. Cependant, de façon générale, l'existence des ponts cytoplasmiques entre cellules résultant d'une même méiose doit permettre des passages d'ARN-m d'une cellule à l'autre, ce qui atténuerait les effets de telles différences.

Pendant la spermiogenèse tardive, les polyribosomes devenus inactifs sont finalement éliminés avec le cytoplasme en excès dans le corps résiduel (voir § 2.3, *infra*).

2.2.3 Les spermatides

Elles restent en contact étroit avec les cellules de Sertoli, mais sont réorientées de façon que la tête du gamète soit enfoncée transitoirement dans le cytoplasme apical d'une de ces cellules. Elles subissent une série de transformations pour former les spermatozoïdes : celle-ci constitue la **spermiogenèse** qui s'achève près de la lumière des tubes qui contient les **spermatozoïdes** mûrs libérés des cellules de Sertoli. Chez l'homme, une spermatide est transformée en spermatozoïde mûr en 3 semaines environ.

1. (3) Ou jonctions de type « gap » (voir § 13.3).

2.3 LA SPERMIOGENÈSE (fig 2.3)

Après la seconde division de la méiose se forment 4 cellules haploïdes, les spermatides, qui vont subir une différenciation complexe en spermatozoïdes. Ceux-ci se dissocient des cellules de Sertoli et deviennent des cellules libres dans la lumière du tube séminifère où elles sont acheminées vers les voies efférentes par les contractions des cellules myoïdes des parois des tubes.

2.3.1 Modifications morphologiques

Quatre événements caractérisent la spermiogenèse : la condensation du noyau, la formation de l'acrosome, le développement du flagelle et de la pièce intermédiaire, la résorption du surplus cytoplasmique.

a) La jeune spermatide (fig 2.3-1)

Elle est encore arrondie, le noyau a une chromatine diffuse et un ou plusieurs nucléoles. L'appareil de Golgi migre vers la future région apicale du spermatozoïde et une vésicule proacrosomique se forme à partir de la coalescence des vésicules golgiennes. Celle-ci est plaquée contre l'enveloppe nucléaire y provoquant une invagination. Le complexe centriolaire avec une amorce de flagelle est voisin de la vésicule proacrosomique. Un réticulum endoplasmique s'organise de façon concentrique autour du noyau. Les mitochondries sont à la périphérie du cytoplasme. Des ponts cytoplasmiques subsistent encore entre spermatides sœurs.

b) Acquisition d'une polarité (fig 2.3-2)

La vésicule proacrosomique s'aplatit à la future surface antérieure du noyau et constitue progressivement le **capuchon céphalique** ou **acrosome**. Celui-ci contient du matériel dense, encore enrichi par l'apport de vésicules golgiennes. Le complexe centriolaire et l'ébauche du flagelle migrent à l'opposé de l'acrosome. Le centriole proximal s'approche du noyau et s'applique étroitement contre l'enveloppe nucléaire dans une invagination de celle-ci. Quand cette migration est achevée, le noyau qui est devenu ovoïde perd ses nucléoles et se condense progressivement. La spermatide a alors acquis une polarité suivant un axe passant par l'acrosome et les centrioles.

c) Condensation du noyau – différenciation de la pièce intermédiaire et du flagelle (fig. 2.3-3 à 2.3-5)

La condensation de la chromatine se poursuit et le contenu du noyau se présente finalement sous l'aspect d'un seul bloc d'hétérochromatine. Sa forme peut varier suivant les espèces : fusiforme chez l'homme, falciforme chez les Rongeurs. L'acrosome recouvre comme une calotte la moitié antérieure du noyau ; un matériel périnucléaire, riche en actine, est présent entre la membrane interne de l'acrosome et l'enveloppe nucléaire (voir § 4.2). La membrane plasmique recouvrant la partie apicale de la spermatide est séparée de la membrane externe de l'acrosome par une mince couche cytoplasmique. En arrière, s'est formée une membrane dense post-acrosomique autour d'une grande partie du noyau. Tout cet ensemble forme la tête de la spermatide. Le cytoplasme s'est

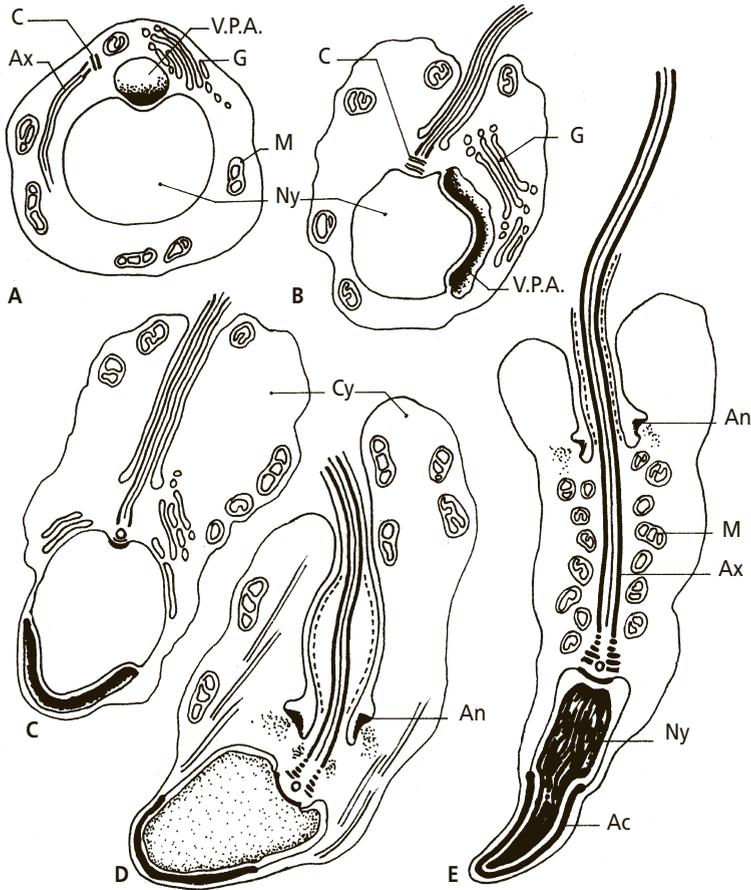


Figure 2.3 - Spermiogenèse.

A : Jeune spermatide. V.P.A. : vésicule proacrosomique, G : appareil de Golgi, C : complexe centriolaire, M : mitochondrie, Ax : amorce de l'axonème. **B** : Acquisition d'une polarité marquée par la position de l'acrosome à l'opposé du complexe centriolaire. **C à E** : Formation de la tête du spermatozoïde avec condensation du noyau (Ny) et de l'acrosome (Ac). Organisation des mitochondries autour de la pièce intermédiaire, recul de l'annulus (An), élimination du cytoplasme excédentaire (Cv) (d'après Holstein et Roosen-Runge, 1981).

retiré progressivement vers l'arrière de la cellule, formant un lobe autour du flagelle et de l'ébauche de pièce intermédiaire. Ce lobe contient des organites qui ne sont plus fonctionnels (Golgi, réticulum, mitochondries excédentaires).

En arrière du noyau, les centrioles se trouvent dans la zone qui formera le cou de la spermatide. Le centriole distal se prolonge par l'**axonème** (une paire de microtubules centraux entourée de 9 doublets de microtubules) autour duquel se différencie neuf faisceaux de fibres denses. En arrière des centrioles, la **pièce intermédiaire** se différencie avec mise en place d'une hélice de mitochondries réalisant un manchon autour des fibres denses. Cette formation suit le recul, le long du flagelle, de l'**annulus** qui est

un épaississement en forme d'anneau, entourant le flagelle, situé sous la membrane plasmique. L'annulus migre ainsi depuis le cou jusqu'à l'emplacement qui constituera la limite postérieure de la pièce intermédiaire.

Le cytoplasme en excès formant le **corps résiduel** est éliminé et phagocyté par les cellules de Sertoli. Une gouttelette cytoplasmique subsiste autour de la région antérieure du flagelle et sera éliminée au moment de la maturation finale dans l'épididyme. Les têtes spermatisées se dégagent des cellules de Sertoli qui les enveloppaient complètement et les spermatozoïdes peuvent être libérés dans la lumière du tube séminifère (phénomène de **spermiation**). À leur libération, les spermatozoïdes sont immobiles et n'acquerront leur mobilité qu'au cours de leur transit dans l'épididyme.

2.3.2 Synthèses au cours de la spermiogenèse

Nous avons signalé plus haut la persistance de synthèses d'ARN post-méiotiques. Les ARN synthétisés dans les spermatocytes codent notamment pour l'élaboration des protéines des organites du spermatozoïde. On peut citer quelques composants essentiels.

a) Protéines nucléaires

La composition en protéines basiques est modifiée à la fin de la spermiogenèse, au moment où la composition d'ensemble du noyau se modifie. Le nucléole disparaît et les ARN nucléaires sont éliminés, de même que les protéines non histones. Le noyau est légèrement déshydraté et la masse haploïde d'ADN atteint 20 % du poids sec du spermatozoïde. La chromatine est alors modifiée, dans des proportions très variables suivant les espèces. En effet, les histones riches en lysine sont progressivement remplacées par des protéines basiques de plus faibles poids moléculaires et synthétisées dans les spermatides. Ce sont des **protamines**, riches en arginine et en cystéine, capables d'établir entre elles des ponts disulfures et contribuant ainsi à la condensation de la chromatine qui acquiert une structure quasi-cristalline. À ce stade, le patron de méthylation spécifique du génome mâle est en place (voir chap. 16.3.3).

b) Protéines du flagelle

Les protéines de l'axonème (tubuline, dynéine, etc.) sont synthétisées et polymérisées au fur et à mesure de sa croissance. Les faisceaux de fibres denses externes contiennent une kératine Sak57 (pour « Sperm-associated keratin 57 »).

c) Protéines et glycoprotéines de l'acrosome

L'acrosome est riche en protéines synthétisées dès le stade pachytène. Il renferme notamment des enzymes lytiques : neuraminidase, phosphatase alcaline, hyaluronidase, acrosine. Cette dernière est une protéase à activité trypsine, fixée à la membrane interne de l'acrosome et qui contribue à la pénétration du spermatozoïde à travers les enveloppes ovulaires lors de la fécondation (voir § 4.2.2c).

d) Protéines membranaires

Les protéines de reconnaissance et de liaison à la membrane vitelline ou à la zone pellucide chez les Mammifères ainsi qu'à la membrane de l'ovocyte se mettent en place dans les structures membranaires de la tête du spermatozoïde (voir § 4.2).

2.4 MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE DES SPERMATOZOÏDES MÛRS

2.4.1 Morphologie (fig. 2.4)

Le spermatozoïde a pour rôle de transférer le patrimoine génétique du mâle vers l'ovule de la femelle. On y distingue la **tête**, porteuse de l'acrosome, organe de pénétration, et du noyau contenant un lot haploïde de chromosomes, la **pièce intermédiaire** et la **queue** qui en sont l'organe locomoteur. Un spermatozoïde mesure de 40 à 250 μm chez les Mammifères (53 μm chez l'homme). Son volume est très réduit par rapport à celui de l'ovocyte : 30 μm^3 chez le taureau, soit 1/20 000 du volume de l'ovule de vache.

Sa structure définitive, chez les Mammifères, s'acquiert hors du testicule, lors de son passage dans l'épididyme.

a) La tête

Elle a une forme qui varie d'une espèce à l'autre (légèrement aplatie chez l'homme, falciforme chez les Rongeurs). Elle contient le noyau que coiffe l'acrosome.

- *La composition du noyau* a été examinée précédemment. Les nouvelles protéines basiques contribuent à la condensation et à la stabilisation de la chromatine qui est totalement sous la forme d'hétérochromatine. Sous cette forme, elle est protégée contre les altérations qu'elle pourrait subir pendant le stockage des spermatozoïdes et leur passage dans les conduits mâles et femelles. Chez les Mammifères, une protéine riche en cystine forme un réseau qui renforce cette protection. La condensation et la déshydratation relative du noyau s'accroissent encore pendant le séjour dans l'épididyme.

- *L'acrosome* acquiert sa forme définitive lors du passage dans l'épididyme. Sa membrane est accolée à la membrane plasmique. Il épouse la forme du noyau; une lame dense post-acrosomique se différencie à son bord postérieur. Son contenu est riche en phospholipides, en glycoprotéines et en enzymes protéolytiques. Ce complexe enzymatique extrait de préparations de spermatozoïdes peut notamment dissocier *in vitro* le ciment intercellulaire des cellules de la **corona radiata** qui entourent l'ovocyte de Mammifère. *In vivo* ce rôle est assuré par les sécrétions des voies génitales femelles qui contribuent largement à cette dissociation (voir chap. 3, Ovogenèse et 4, Fécondation).

b) Le flagelle

Il comprend le cou, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

- *Le cou* comporte le centriole proximal disposé derrière le noyau dont il est séparé par la plaque basale, et le départ de l'axonème, celui-ci s'étant constitué à partir du centriole distal. Une pièce connective segmentée relie la partie postérieure du noyau aux fibres denses.

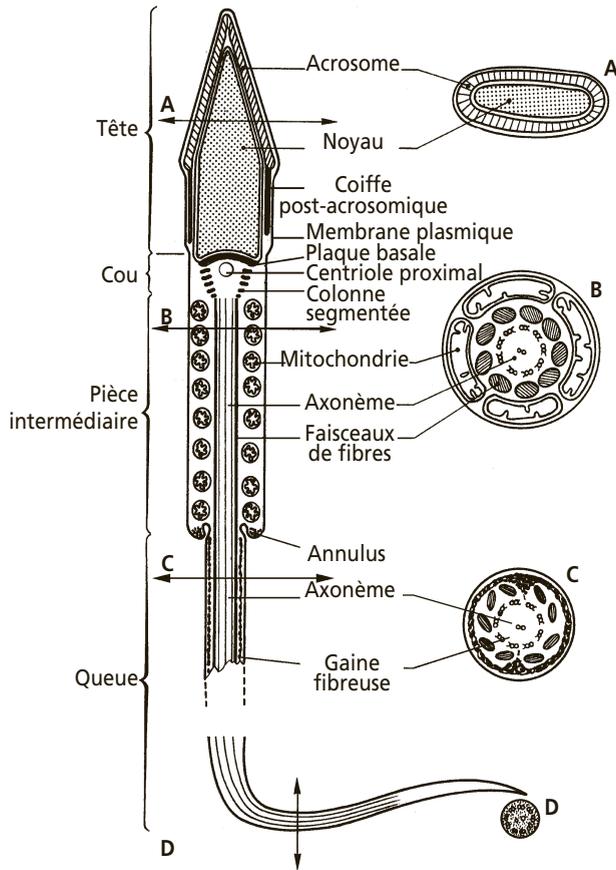


Figure 2.4 - Schéma d'un spermatozoïde de Mammifère.

- *La pièce intermédiaire* possède autour de l'axonème, 9 faisceaux de fibres denses de nature protéique et riches en triglycérides et des mitochondries; l'annulus constitue sa limite postérieure. Lors du transit dans l'épididyme, les mitochondries s'organisent en hélice et la pièce intermédiaire perd la gouttelette cytoplasmique.
- *La pièce principale* est longue; elle ne comprend plus de mitochondries, mais contient les 9 faisceaux de fibres denses et une gaine fibreuse qui entourent l'axonème. Cette gaine et ces fibres disparaissent à l'extrémité du flagelle qui constitue la **pièce terminale**. Ces deux éléments constituent la queue du spermatozoïde.



Chez la plupart des espèces, les spermatozoïdes comportent tête, pièce intermédiaire et flagelle. Il faut signaler des exceptions importantes : les spermatozoïdes sont dépourvus de flagelles et sont amiboïdes chez certains Crustacés et Insectes et chez les Nématodes.

2.4.2 Biologie

a) Motilité du spermatozoïde : rôle de la pièce intermédiaire et du flagelle

Lors de leur transit dans l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité. Celle-ci implique deux éléments essentiels que sont le complexe axonémal du flagelle et les mitochondries de la pièce intermédiaire. Les microtubules périphériques sont liés à des **dynéines**, moteurs moléculaires à activité ATPasique. Les mitochondries assurent les **phosphorylations oxydatives** apportant l'ATP dont l'hydrolyse par l'activité ATPasique des bras des dynéines produit l'énergie nécessaire aux battements du flagelle et à la survie du spermatozoïde. Les sources d'énergie sont fournies par des éléments externes (fructose du liquide séminal), plus rarement par des réserves endocellulaires (phospholipides des spermatozoïdes d'oursin). Ils sont dégradés par les processus de la glycolyse en l'absence d'oxygène, avec formation d'acide pyruvique et lactique. En présence d'oxygène, les enzymes mitochondriales complètent leur dégradation avec formation de CO_2 et H_2O . Ce mécanisme permet à la cellule d'effectuer de longs parcours.

Les spermatozoïdes pourraient se déplacer chez l'homme à une vitesse de 35 à 50 $\mu\text{m}/\text{seconde}$ à 37 °C, cette vitesse étant encore accrue dans le tractus génital femelle. Si la durée de la mobilité est courte chez les espèces à fécondation externe (ne dépassant pas quelques minutes), elle peut être longue dans les cas de fécondations internes (plusieurs heures, voire quelques jours).

b) Acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes, au sortir du testicule, n'ont pas encore la capacité de féconder un ovule. Ils subissent une première série de transformations dans les voies mâles, aboutissant à l'acquisition du **pouvoir fécondant**, au moment de la traversée de l'épididyme sous l'effet de ses sécrétions. La durée de cette traversée varie avec les espèces (1 à 12 jours chez l'homme), les spermatozoïdes peuvent séjourner dans la queue de l'épididyme qui sert de réservoir. L'épididyme est un tube très contourné résultant de la différenciation du canal de Wolff (voir § 17.2.3), il peut atteindre 7 m chez l'homme, sa paroi épithéliale sécrétrice, entourée de fibres musculaires lisses, sécrète des protéines sous l'action de la testostérone.

• *Modifications morphologiques*

Pendant l'acquisition du pouvoir fécondant, la condensation de la chromatine se poursuit par augmentation des ponts disulfures. La stabilité de la membrane plasmique est accrue par des remaniements au niveau des lipides. Certaines protéines membranaires sont éliminées tandis que d'autres s'y fixent. La topographie des chaînes glycosidiques à la surface de la membrane est modifiée. L'hélice mitochondriale achève sa mise en place pendant ce transit. L'acrosome subit des remaniements morphologiques.

• *Modifications fonctionnelles*

Le spermatozoïde acquiert la possibilité de se déplacer suivant une progression rectiligne dans l'épididyme.

Il achève d'acquérir l'aptitude à se fixer aux structures enveloppantes de l'ovule (par exemple la zone pellucide chez les Mammifères), grâce à la mise en place de protéines membranaires reconnaissant celles-ci (certaines d'entre elles, comme une galactosyltransférase, étaient déjà en place chez les spermatozoïdes dans les testicules). Ces molécules sont protégées et non fonctionnelles jusqu'à la **capacitation**.

L'activité des enzymes de l'acrosome est neutralisée par les sécrétions de l'épididyme, évitant ainsi une attaque des voies génitales mâle et femelle en cas de lyse des spermatozoïdes.

On montre que l'acquisition du pouvoir fécondant s'acquiert progressivement en pratiquant des expériences de fécondation artificielle avec des spermatozoïdes prélevés dans la tête, le corps et la partie terminale de l'épididyme. Seuls les derniers ont un taux de fécondation normal. Chez l'homme, toutefois, le pouvoir fécondant semble acquis dès le début du transit.

Les sécrétions des glandes annexes, dérivées du canal de Wolff (vésicules séminales) ou du sinus uro-génital (prostate, glande de Cowper) jouent un rôle dans l'élaboration du sperme : elles constituent les 3/4 du liquide séminal et contiennent entre autres du fructose.

Chez les animaux marins, la motilité et le pouvoir fécondant sont acquis au contact de l'eau de mer. Il y aurait donc, dans tous les cas, nécessité d'une modification du milieu (voir § 4.1.1.).

c) Capacitation

Chez les Mammifères, au sortir des voies mâles, les spermatozoïdes ainsi modifiés sont toutefois incapables de féconder un ovule, comme le montrent les essais de fécondation *in vitro*. Ils doivent au préalable subir de nouvelles transformations ou **capacitation**, dans les voies génitales femelles. La durée de ce phénomène est fonction du temps de transit épидидymaire et de la phase du cycle œstrien où se trouve la femelle. La capacitation est rapide au moment de l'ovulation, mais elle ne se produit pas pendant la phase lutéale. De même, sa durée est d'autant plus courte que le temps de transit dans l'épididyme a été rapide.

Pendant la capacitation, le plasma séminal sécrété par les glandes annexes et les protéines stabilisantes déposées dans les voies mâles vont être éliminés. Les sites récepteurs membranaires permettant la reconnaissance de la zone pellucide sont démasqués par l'action d'enzymes protéolytiques contenus dans les sécrétions utérines. Ces récepteurs se regroupent sur la région antérieure de la tête du spermatozoïde.

La capacitation est plus facile en période d'ovulation, car ces sécrétions sont enrichies en enzymes protéolytiques et contiennent des éléments favorables à la survie du spermatozoïde : taux élevé de K^+ , haute teneur en glycine. Des mouvements ioniques accompagnent l'activation du spermatozoïde; ainsi, une libération du Ca^{++} intracellulaire et un influx de Ca^{++} externe stimulent successivement l'activité d'une adénylate cyclase membranaire, la production consécutive d'AMPC,

la phosphorylation de protéines, (en particulier de protéines de choc thermique qui ont migré dans la tête du spermatozoïde) et y forment les récepteurs qui se lient à la zone pellucide (Asquith et coll., 2004, 2005). Ces phosphorylations entraînent des changements dans le déplacement des spermatozoïdes. Ceux-ci présentent un **état d'hyperactivité** se traduisant par une modification des battements flagellaires et des déplacements erratiques plus ou moins circulaires, favorables à une meilleure pénétration dans un milieu visqueux.

L'inhibition de l'activité des enzymes de l'acrosome est levée ; la rupture de l'acrosome et l'exocytose de son contenu deviennent possibles à la suite de remaniements affectant les constituants de la membrane plasmique (perte de cholestérol par exemple) et de la membrane acrosomique.

La capacitation est réversible : des spermatozoïdes capités peuvent perdre les caractéristiques acquises au cours de la capacitation s'ils sont replacés dans le liquide séminal.

Chez les espèces autres que les Mammifères Euthériens (ou Placentaires vrais), c'est le contact avec les enveloppes de l'ovule qui active le spermatozoïde et stimule au maximum sa motilité. Chez les Euthériens, il semble qu'au cours de l'évolution, l'ovule ait perdu l'aptitude à provoquer la réaction acrosomique (voir § 4.2.2) La stimulation du spermatozoïde par des sécrétions de l'oviducte répondrait à une nécessité pour lui d'être stimulé plus tôt pour parvenir à traverser des enveloppes péri-ovulaires particulièrement nombreuses et difficilement franchissables, comparées à d'autres espèces (Bedfond et coll., 1983).

d) Durée de la vie dans le tractus génital femelle

Elle est variable suivant les espèces. Un des cas extrêmes est celui de l'abeille ; les spermatozoïdes survivent 2 ou 3 ans dans la spermathèque de la reine. Chez les Mammifères, elle ne dépasse pas quelques jours en général (2 à 3 chez la femme).

e) Spermatozoïdes « mâles » et spermatozoïdes « femelles »

On sait distinguer les gamètes porteurs du chromosome X ou Y. La coloration à la quinacrine rend le chromosome Y fluorescent. La tête des spermatozoïdes porteurs de Y est plus petite, ils se déplacent plus rapidement, mais sont moins résistants, leur survie en milieu alcalin est meilleure. Une technique de tri en cytométrie de flux basée sur une faible différence dans la quantité d'ADN entre les spermatozoïdes X et Y permet de les séparer. Cette pratique a donné des résultats chez le lapin mais le rendement en est très faible.

f) Évaluation de l'activité spermatogénétique

L'activité mitotique de l'épithélium séminifère est très intense et dure toute la vie sexuelle mais ralentit avec l'âge. Pendant un seul cycle de l'épithélium germinatif, la productivité est de 200 000 spermatides par centimètre de tube séminifère. Chez le lapin, la production de spermatozoïdes par les deux gonades est estimée à 80 000 par minute. De nombreux facteurs peuvent modifier la productivité spermatogénétique (voir encart 2.1).

2.4.3 Anomalies de la spermatogenèse

L'anomalie peut porter sur la forme du spermatozoïde (2 têtes, 2 flagelles...) ou sur la formule chromosomique, cette dernière étant anormale dans 5 à 10 % des gamètes. On rencontre des spermatozoïdes à structure anormale dans le liquide séminal. Ces spermatozoïdes n'ont pas de pouvoir fécondant. Les anomalies sont très fréquentes chez les individus à taux de fécondité bas (supérieures à 40 %). On note, au cours de la spermatogenèse, la dégénérescence de certains spermatocytes porteurs sans doute d'un équipement chromosomique anormal résultant d'une méiose anormale. C'est ainsi que, chez le mulet résultant d'un croisement baudet-jument, l'appariement des chromosomes se fait difficilement et les gamètes dégèrent au stade spermatocyte I.

Dans l'espèce humaine, des anomalies de spermatogenèse peuvent résulter d'une formule chromosomique anormale. L'homme porteur du **syndrome de Klinefelter** est phénotypiquement mâle avec XXY; il est stérile, car la gamétogenèse ne dépasse pas le stade des spermatocytes. Dans le **syndrome du Testicule féminisant (TFm)** où il n'existe pas de récepteurs cellulaires à la testostérone dans les tissus, par suite d'une délétion, la spermatogenèse est aussi abortive (voir § 17.4.2).



ENCART 2.1 Facteurs susceptibles d'affecter la spermatogenèse

- **Une température plus élevée que la normale** est préjudiciable à la spermatogenèse. Chez la plupart des espèces de Mammifères, les testicules subissent au cours du développement une descente hors de la cavité abdominale jusque dans le scrotum. Cette localisation peut être permanente (exemple chez l'homme) ou saisonnière, liée à la période d'activité sexuelle (exemple des chauves-souris). Chez les espèces ayant normalement une migration testiculaire, l'absence de celle-ci (**cryptorchidie**) entraîne de graves anomalies de la spermatogenèse pouvant aboutir à une stérilité. Les gonades se trouvant dans ce cas à une température de 3 à 5 °C plus élevée que dans le scrotum, présentent une dégénérescence de la lignée germinale. Une forte fièvre, la pratique de bains chauds fréquents altèrent également la spermatogenèse.

Si l'on pratique chez le rat une cryptorchidie expérimentale en remplaçant l'un des testicules dans la cavité abdominale, l'autre restant en place servant de témoin, on constate que les cellules germinales sont d'autant plus sensibles à l'élévation de la température qu'elles sont avancées dans le processus de la spermatogenèse. Leur élimination se réalise progressivement et au bout de 35 jours, le testicule cryptorchide est envahi de tissu fibreux dépourvu de cellules germinales.

- **Des avitaminoses**, dues à des carences en vitamines A et surtout E, entraînent une perte totale et irréversible des spermatogonies chez le rat.

- **Les radiations ionisantes** exercent un effet sur les spermatogonies, cellules indifférenciées et se multipliant activement, qui s'avèrent très radiosensibles. Chez l'homme, des doses de 0,5 à 2 Gy provoquent une diminution, voire un arrêt momentané de la production des spermatozoïdes. Cette régression transitoire devient irréversible pour des doses supérieures à 6 Gy.

 ENCART 2.1 (SUITE)

▪ **Des radiations électromagnétiques pulsées, émises par des tubes cathodiques** ont provoqué des anomalies du développement ou des morts embryonnaires sur des modèles expérimentaux comme la drosophile. Dans des cultures de biopsies de testicules humains soumises à ces rayonnements, la mortalité cellulaire apparaît 3 fois plus élevée que dans les biopsies cultivées dans des conditions normales. Les phases de mitoses (spermatogonies) et de la méiose (formation des spermatocytes II et des spermatides) semblent les plus sensibles.

▪ **Des substances interférant avec l'activité hormonale** dites perturbateurs endocriniens comme certains pesticides ou diverses substances chimiques ont une action stérilisante ou tératogène. Ils empêchent le déroulement des fonctions endocrines à différents niveaux, en agissant comme des analogues d'hormones, notamment des œstrogènes, auxquelles ils se substituent, ou comme des inhibiteurs de récepteurs hormonaux, etc. Entre autres nuisances, ils affectent le déroulement de la gamétogenèse dans les deux sexes et provoquent une forte baisse de fécondité. On peut citer la dioxine dont l'effet réducteur de la spermatogenèse sur le rat a été montré. Le PCB (dérivé chloré présent dans des peintures, plastiques, etc.) affecte les récepteurs d'œstrogènes et limite la fertilité chez les amphibiens. Le méthoxychlore, présent dans de nombreux pesticides, a des effets analogues. Des études américaines sur la baisse de la population d'alligators dans un de leurs lacs (Apopka) montre qu'ils sont victimes de déséquilibres hormonaux aboutissant à une augmentation de leur stérilité ; ces anomalies résulteraient de l'effet de ces pesticides polluant leurs eaux. Récemment, il a été démontré que la présence de phtalates (additifs couramment utilisés dans les matières plastiques souples et en cosmétologie) tel le MEHP, provoquaient en 3 jours dans des testicules fœtaux humains cultivés *in vitro*, une réduction drastique du nombre des gonocytes primordiaux (Rouiller-Fabre et Habert, 2008).

2.5 LES HORMONES SEXUELLES ET LE CONTRÔLE DE LA GAMÉTOGÈSE

2.5.1 Caractères communs aux deux sexes

La régulation hormonale de la gamétogenèse présente des caractères communs au mâle et à la femelle, qui seront exposés ici, avant d'étudier le contrôle de la spermatogenèse.

a) Notions d'organisation du complexe hypothalamo-hypophysaire

L'hypothalamus est un centre neuro-glandulaire situé à la base du cerveau moyen, le diencéphale. Il est en relation étroite avec l'hypophyse, glande endocrine dont le lobe antérieur provient de l'ectoderme buccal de l'embryon (voir § 8.5.1) et dont le lobe postérieur est, comme l'hypothalamus, originaire du diencéphale. Des relations fonc-

tionnelles très étroites existent entre l'hypothalamus et l'hypophyse, notamment une vascularisation sanguine particulière qui permet un transfert rapide d'hormones.

Le système nerveux central intègre des stimuli physiologiques et environnementaux et exerce un contrôle sur la fonction reproductrice par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Parmi les produits sécrétés par l'hypothalamus, une gonadolibérine, la **GnRH** (pour « **Gonadotrope Releasing Hormone** ») contrôle l'activité hypophysaire quant à sa production d'hormones responsables de l'activité des gonades, les gonadotrophines. Gonadolibérine et gonadotrophines hypophysaires agissent sur des cellules cibles en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques. Par le jeu de la stimulation hypophysaire, les gonades sécrètent des hormones stéroïdes sexuelles et des peptides capables d'exercer des actions directes sur divers tissus et organes et des rétrocontrôles sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

(À noter que, lors de la gestation, le placenta produit également des gonadotrophines dites chorioniques, chez les Primates notamment; voir § 10.7.3b).

b) Sécrétions hormonales du complexe hypothalamo-hypophysaire

Au cours de la régulation hormonale de l'activité sexuelle, l'hypothalamus sécrète une gonadolibérine, la GnRH, un décapeptide qui stimule la production, par l'hypophyse antérieure, de deux gonadotrophines hypophysaires : la **LH** (pour « **Luteinizing Hormone** » ou **hormone lutéotrope**) et à un degré moindre, la **FSH** (pour « **Follicle-Stimulating Hormone** » ou **hormone folliculo-stimulante**). La GnRH est parfois désignée sous le terme de **LH-RH** (pour « **LH-Releasing Hormone**)¹. La GnRH et les gonadotrophines sont sécrétées de façon corrélée, selon un mode pulsatile. Celui-ci peut être modifié par de nombreux facteurs environnementaux et/ou hormonaux agissant de façon rétroactive. Les gonadotrophines stimulent sélectivement les sécrétions par les gonades d'hormones stéroïdes sexuelles (testostérone, œstradiol) et des facteurs protéiques (inhibines, activines).

c) Sécrétions d'hormones stéroïdes par les gonades

Les hormones stéroïdes sexuelles sont élaborées à partir du cholestérol par des cellules du tissu interstitiel. On rencontre dans la chaîne de leur synthèse la même succession de substances dans les deux sexes parmi lesquelles, dans l'ordre d'apparition, la **progestérone**, la **testostérone** et l'**œstradiol**. Le produit final le plus abondant dépend du sexe. Les hormones stéroïdes se couplent à des protéines réceptrices de leurs cellules cibles, qui sont intracellulaires et qui, se liant à l'ADN, régulent l'activité de gènes.

d) Sécrétions d'hormones peptidiques par les gonades

Ce sont les **inhibines** et les **activines**. L'inhibine est une glycoprotéine constituée par l'association de deux sous-unités α et β , reliées entre elles par un pont disulfure.

1. Certaines données avaient fait penser qu'il pouvait exister une FSH-RH. Cette hypothèse n'est pas avérée à ce jour.

Seule la sous-unité α est glycosylée. Deux types d'inhibine A et B sont connus selon la nature de la sous-unité β qui possède deux variants possibles, β_A et β_B . Les activines sont des dimères formés par deux sous-unités β des inhibines et sont donc connues sous trois formes A, B et AB, selon la nature des variants associés¹.

Ces hormones sont sécrétées par des cellules somatiques possédant une même origine, cellules de Sertoli chez le mâle et cellules de la granulosa chez la femelle. L'activine est trouvée dans d'autres cellules (cellules interstitielles) ou tissus (osseux, érythropoïétique) ; elle est aussi un des inducteurs du mésoderme (voir § 12.5.8c).

C'est enfin une règle commune aux deux sexes que les hormones stéroïdes et les inhibines régulent la synthèse et la sécrétion des hormones hypothalamiques et hypophysaires : c'est une **régulation en retour** (ou « feed-back ») qui est le plus souvent négative.

Ces régulations hormonales, de la spermatogenèse comme de l'ovogenèse, dépendent de facteurs très complexes dont seules les grandes lignes seront exposées ici. Il s'y ajoute, notamment pour l'ovogenèse, une certaine variabilité suivant les espèces. C'est l'homme qui est retenu ici comme modèle principal.

2.5.2 Contrôle hormonal de la spermatogenèse (fig. 2.5)

a) Sécrétions des cellules de Leydig

Ces cellules sont la principale source d'hormones stéroïdes sexuelles mâles. Leur activité est périodique chez les animaux à reproduction saisonnière.



Elles sont activées par la LH et par des facteurs produits par les cellules de Sertoli (inhibines, IGF-1) pour synthétiser essentiellement la **testostérone**. Elles n'ont pas de récepteurs à la FSH, mais cette hormone exerce un effet indirect en stimulant les cellules de Sertoli qui, par la sécrétion de médiateurs locaux (ABP, voir § 2.1.3a) modulent l'action de la testostérone et les fonctions des cellules de Leydig en les stimulant ou en les inhibant (activine, TGF- β). Ces fonctions sont aussi influencées par les cellules germinales produisant du TNF α (pour « Tumor Necrotic Factor α ») à effet inhibiteur et par le stade du cycle spermatogénétique dans lequel se trouvent les tubes séminifères voisins.

La **testostérone** contribue à la persistance d'une activité spermatogénétique régulière chez l'adulte en association avec d'autres hormones comme la **prolactine (PRL)**, hormone peptidique de l'antéhypophyse qui stimule la formation et le maintien des récepteurs à la LH. Les cellules germinales n'ayant pas de récepteurs à la testostérone, cette hormone ne peut avoir qu'une action indirecte, avec les cellules de Sertoli comme intermédiaires.

1. Trois sous-unités supplémentaires β_C , β_D et β_E ont été caractérisées formant des homodimères (activines C, D et E). L'activine D n'a été décrite que chez le xénope. Les sous-unités α , β_A et β_B montrent des homologies entre elles ; activines et inhibines font partie de la super-famille des TGF- β dans la mesure où ceux-ci sont des homodimères formés à partir de sous-unités β très proches de celles des activines et inhibines.

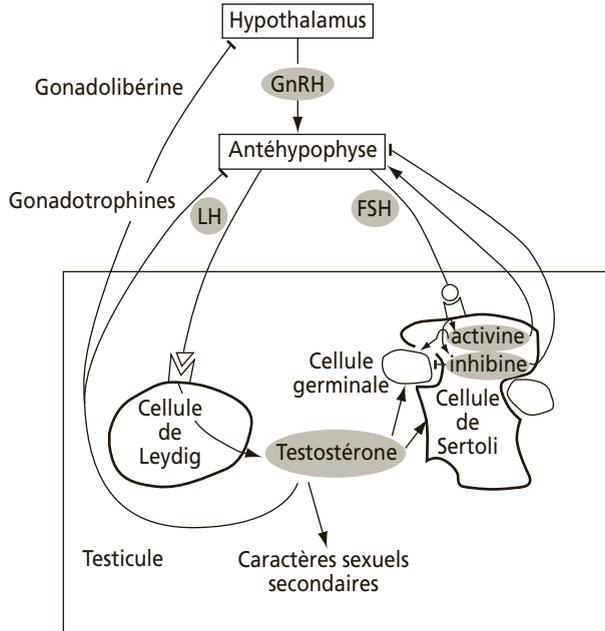


Figure 2.5 - Schéma des interactions hormonales régulant la spermatogénèse.

Les actions stimulantes sont représentées par (→), les actions inhibitrices par (−). Les cellules de Sertoli ont à la fois une activité régulatrice indirecte positive sur la spermatogénèse, par leurs activines, et négative, par leurs inhibines.

Elle stimule l'expression des caractères sexuels secondaires dès la puberté : comportement, pilosité, caractères propres de la musculature, squelette, etc.

Elle exerce, avec certains de ses métabolites, une régulation en retour sur l'hypothalamus et l'hypophyse : ils inhibent la libération de GnRH et, des hormones hypophysaires, celle de la LH en totalité, celle de la FSH partiellement.

Nous verrons plus loin (voir § 17.5) qu'elle intervient déjà chez le fœtus dans la différenciation sexuelle.

b) Sécrétions des cellules de Sertoli

L'activité de ces cellules est régulée par des hormones (FSH et testostérone) mais également par des facteurs locaux émis par les cellules germinales et les cellules de Leydig. A la suite de ces interactions, elles secrètent des produits exerçant des effets activateurs ou inhibiteurs sur divers organes ou cellules cibles. Sous l'influence de la FSH, les cellules de Sertoli produisent notamment :

- *IGF-1* (pour « Insulin-like Growth factor ») qui stimule la prolifération des spermatogonies et active la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig,

Partie 1 • Gamétogenèse et fécondation

- *les inhibines* qui exercent un rétro-contrôle négatif sur l'hypophyse pour bloquer la synthèse et la libération de la FSH, régulent négativement la multiplication des spermatogonies et potentialisent au niveau des cellules de Leydig l'effet de la LH sur la production d'hormones androgènes,
- *l'ABP*, transporteur de la testostérone et dihydrotestostérone,
- *du lactate et de la transferrine*, la production de cette dernière étant également contrôlée par la testostérone.

Parmi les autres sécrétions des cellules de Sertoli, certains facteurs paracrines (facteurs de croissance, cytokines) peuvent stimuler la prolifération des spermatogonies ou leur engagement dans la spermatogenèse (IL-1, EGF, GDNF cités § 2.2.2a), cependant que d'autres ont des actions inhibitrices sur les cellules germinales (IL-6, TGF- β) ou sur les cellules de Leydig (TGF- β , activines). Les activines exercent un rétro-contrôle positif sur la synthèse de la FSH et sont sans action sur la LH.

Enfin, elles sécrètent pendant la vie foetale l'**hormone antimüllérienne** qui provoque chez l'embryon mâle la régression des oviductes embryonnaires ou canaux de Müller (voir § 17.4.5d).

Les **cellules de Leydig** et les **cellules de Sertoli** émettent, ainsi qu'on l'a vu, des médiateurs locaux qui leur permettent de réguler mutuellement leur fonctionnement de façon harmonieuse. Les **cellules myoïdes**, situées à la périphérie des tubes séminifères, jouent aussi, par leurs sécrétions, un rôle régulateur dans l'activité des cellules de Sertoli.

c) La voie hypothalamo-hypophysaire

Les **stimuli sensoriels** externes peuvent agir sur l'activité spermatogénétique. On a ainsi montré l'influence stimulante de la lumière chez les Oiseaux et chez les Mammifères. La perception visuelle ou olfactive de la présence d'un partenaire sexuel peut jouer un rôle : on a montré que sa vue provoquait chez le taureau une décharge de LH, ce qui déclenche rapidement un pic de sécrétion de testostérone (Austin, 1972).

Résumé

Dans les deux sexes, le complexe hypothalamo-hypophysaire contrôle la production d'hormones stéroïdes et d'hormones peptidiques sécrétées par les gonades. Chez le mâle, les cellules de Leydig du tissu interstitiel testiculaire et les cellules de Sertoli de la paroi des tubes séminifères sont les sources respectives de chacune de ces hormones qui régulent la spermatogenèse ; nous verrons que ces cellules ont leurs homologues dans les ovaires, celles-ci sécrétant les hormones qui régulent l'ovogenèse.

Questions

- 2.1 Quels sont les principaux rôles attribués aux cellules de Sertoli ?
- 2.2 Qu'appelle-t-on spermiation ?
- 2.3 Quels sont les traits principaux de la spermiogenèse ?
- 2.4 À quel moment peut-on observer l'ensemble de la spermatogenèse chez l'homme ?
- 2.5 À partir de quel moment les spermatozoïdes acquièrent-ils leur mobilité ?
- 2.6 Qu'appelle-t-on fécondance ?
- 2.7 Quelles sont les principales causes reconnues pouvant affecter la production de spermatozoïdes ?
- 2.8 Quels sont les rôles des cellules de Leydig ?
- 2.9 En quoi l'axe hypothalamo-hypophysaire est-il important pour la spermatogenèse ?
- 2.10 Qu'appelle-t-on capacitation ?

Réponses page 380

3

OVOGENÈSE

PLAN

- 3.1 Développement des cellules reproductrices et du follicule ovarien
- 3.2 Hormones sexuelles et contrôle de l'ovogenèse
- 3.3 Synthèses dans l'ovocyte pendant l'ovogenèse
- 3.4 Maturation de l'ovocyte
- 3.5 L'ovogenèse chez la drosophile
- 3.6 Résultat de l'ovogenèse : complexité de la cellule œuf

L'ovogenèse est l'ensemble des processus conduisant à la formation des gamètes femelles, les ovules ou plus improprement, « œufs vierges ». Elle se déroule dans l'ovaire où les cellules sexuelles sont associées à des cellules somatiques, les cellules folliculeuses, l'ensemble formant un follicule ovarien. Il a été démontré chez certaines espèces (drosophile, ascidies par exemple), que les cellules folliculeuses contribuent à définir la polarité de l'ovocyte, ce qui déterminera celle de l'embryon. Elles ont par ailleurs une activité hormonale chez les Vertébrés. Pendant l'ovogenèse, des ARN et des protéines spécifiques sont synthétisés et s'accumulent dans le cytoplasme de l'ovocyte. Des substances de nature et d'origine diverses peuvent également s'accumuler et constituer des réserves vitellines. À la fin de la croissance l'achèvement de la méiose, souvent sous contrôle hormonal, aboutit à l'émission des globules polaires. Leur émission est différée dans certaines espèces et ne s'achève qu'avec la fécondation.

Les aspects morphologiques de cette étude s'appuieront essentiellement sur une description de l'ovogenèse chez les Mammifères. L'étude des biosynthèses portera en majorité sur les modèles Amphibien et Mammifère.

L'ovogenèse chez la drosophile sera étudiée car sa connaissance est nécessaire pour comprendre les mécanismes d'expression des gènes du développement.

3.1 DÉVELOPPEMENT DES CELLULES REPRODUCTRICES ET DU FOLLICULE OVARIEN

3.1.1 Ovogonies

Chez les Vertébrés, au cours du développement embryonnaire, des cellules germinales primordiales (CGP) colonisent des ébauches de gonades femelles qui deviennent des ovaires (voir chap. 17). Ces cellules germinales se multiplient activement et forment des ovogonies. Ce sont des cellules diploïdes d'aspect indifférencié. Elles sont de grande taille et arrondies, avec un noyau dont la chromatine est finement granulaire, et qui contient 1 ou 2 nucléoles.

Leur cytoplasme possède peu d'organites : quelques mitochondries, peu de réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi réduit. Elles se trouvent dans l'épaisseur de l'épithélium germinatif dont la prolifération a été induite par l'arrivée des cellules germinales et elles s'y multiplient. Les ovogonies issues d'une même cellule germinale restent reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques, leurs divisions sont synchrones. L'activité mitotique dans les ovogonies est limitée dans le temps chez de nombreuses espèces : chez les Vertébrés notamment, on peut distinguer deux catégories.

a) Chez les Amphibiens et quelques Poissons osseux

L'activité mitotique est saisonnière. Les mitoses surviennent après chaque ponte et reconstituent un lot d'ovocytes qui, après la croissance, formeront une ponte ultérieure. Des nids d'ovogonies quiescentes subsistent donc en permanence dans les ovaires de la femelle adulte.

b) Chez les Vertébrés supérieurs

À de rares exceptions près, les ovogonies cessent de se diviser avant la fin de la vie embryonnaire ou peu après la naissance : 4 à 8 jours après l'éclosion chez le poussin, environ 4 mois avant la naissance chez la femme. Une grande partie des ovogonies ayant cessé de se diviser commence à dégénérer, les autres entrent en méiose et deviennent des ovocytes primaires. Les ovaires du fœtus féminin contiennent plusieurs millions de cellules germinales qui dégénéreront massivement au cours de la période périnatale. Cette dégénérescence (ou **atrésie**) se poursuivra puisque, sur les 1 à 2 millions d'ovocytes I présents à la naissance, il n'en restera plus que quelques dizaines de milliers chez la fillette au moment de la puberté. Seuls 400 à 500 poursuivront leur évolution au cours de la vie adulte (voir tableau 3.1).

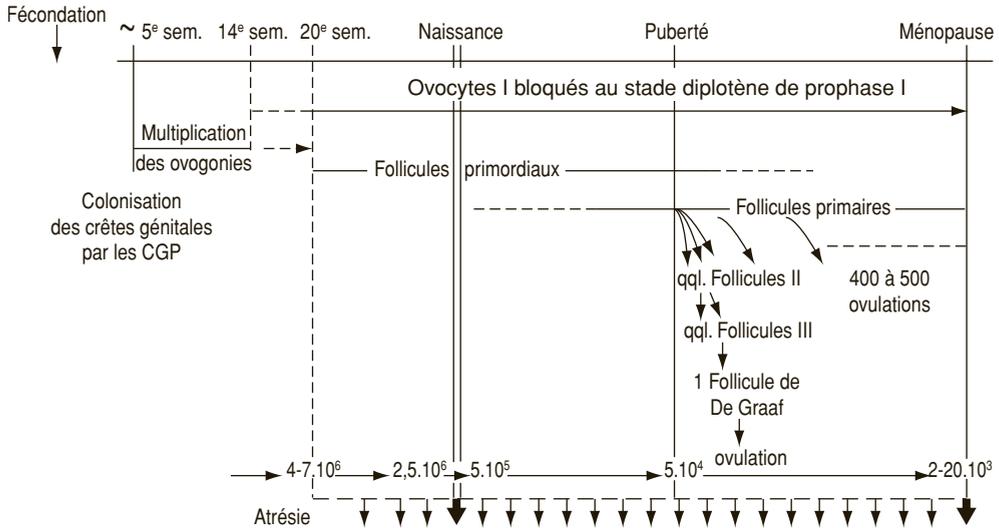
Tout récemment, il a été montré que contrairement à ce qui semblait définitivement acquis, il subsisterait dans l'ovaire, après la naissance chez les Mammifères, des cellules souches germinales ovogoniales. Ces dernières, mises en évidence dans l'ovaire de jeunes souris adultes, seraient susceptibles de reconstituer la réserve de follicules au cours de la vie de la femelle adulte (Johnson et coll., 2004).

Chez les Insectes, les ovogonies cessent de se multiplier au dernier stade larvaire, avant la mue imaginale.

3.1.2 Ovocytes

Les ovocytes I, issus des ovogonies ayant cessé de se diviser, entrent rapidement en phase S (préleptotène), au cours de laquelle l'ADN chromosomique se duplique une dernière fois. Par exemple, chez les Mammifères, cette phase se situe avant la naissance ce qu'on démontre en injectant de la thymidine ^3H à des jeunes embryons de souris et à des souriceaux nouveau-nés : les premiers l'incorporent encore dans les noyaux de leurs ovocytes, mais les souriceaux, chez qui la duplication de l'ADN est achevée, n'incorporent plus le précurseur. Chez les Vertébrés amniotes, l'entrée en méiose ne se réalise pas de façon synchrone pour l'ensemble

Tableau 3.1 Évolution qualitative et quantitative des cellules germinales et des follicules au cours de la vie de la femme.



des cellules germinales : la multiplication des ovogonies continue alors qu'elle a cessé pour d'autres cellules devenues de jeunes ovocytes I qui entrent en méiose. Ainsi, chez le fœtus humain, ce passage s'observe à partir de la septième semaine de gestation et se prolonge sur une durée de sept mois environ.

Dans le cytoplasme d'un ovocyte jeune, la plus grande partie des organites est rassemblée dans une aire limitée voisine du noyau, le **corps vitellin de Balbiani**. Il est formé de mitochondries, de réticulum endoplasmique, de lysosomes et d'un appareil de Golgi développé.

Dans le noyau, les nucléoles restent volumineux, cependant que les chromosomes se spiralisent au stade leptotène puis s'apparient au stade zygotène. C'est durant ce dernier stade qu'apparaissent les complexes synaptonémaux entre les chromosomes homologues appariés. Ces structures se résorbent au stade diplotène, les chromosomes homologues n'étant plus appariés qu'au niveau des chiasma.

Chez la plupart des Vertébrés avec une seule période périnatale de multiplication des ovogonies, le stade diplotène est atteint peu après la naissance. Le noyau de l'ovocyte I reste à ce stade, avec des chromosomes qui se décondensent, jusqu'à la maturation marquée par la reprise de la méiose, peu avant la ponte ovulaire. Il est désigné sous le terme de **vésicule germinative**. Ce délai peut donc atteindre de 12 à 50 ans environ chez la femme, suivant qu'on considère un ovocyte émis au moment de la puberté ou peu avant la ménopause. On parle parfois de stade dictyotène pour caractériser les ovocytes qui sont au stade diplotène, mais ne transcrivent pas d'ARN pendant la longue période qui précède la maturation finale et la ponte ovulaire.

Chez les Amphibiens et les Poissons, dès la fin des mitoses ovogoniales saisonnières, les ovocytes dupliquent leur ADN et entrent de la même façon en prophase de méiose.

C'est au cours du stade diplotène que l'ovocyte synthétise des ARN et des protéines fondamentales pour le développement du futur embryon et qu'il accumule des réserves. On peut considérer que cette étape constitue le véritable début du développement embryonnaire. Comme ces activités ne peuvent se dérouler qu'en association avec des cellules somatiques qui forment le follicule ovarien, l'évolution de ce dernier sera étudiée avant d'aborder les synthèses.

3.1.3 Développement des follicules ovariens

a) Relations entre ovocytes et cellules folliculeuses (fig. 3.1)

Chez tous les Vertébrés et chez la plupart des Invertébrés, peu après la fin des mitoses ovogoniales, quelques cellules somatiques dérivées de l'épithélium des ébauches ovariennes forment une couche enveloppant chaque ovocyte jeune. L'association cellulaire ainsi formée constitue un **follicule**. La formation de celui-ci ainsi que l'entrée en méiose de la cellule germinale s'accompagnent de la rupture des ponts cytoplasmiques qui avaient relié les ovogonies issues d'une même cellule souche. Des contacts étroits s'établissent entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses, avec la formation de jonctions communicantes assurant un couplage métabolique entre ces deux types cellulaires et la présence de jonctions d'adhérence dites intermédiaires, non desmosomales. Quand les cellules folliculeuses se multiplient, une couche acellulaire amorphe se met en place entre celles-ci et l'ovocyte. Cette zone est désignée selon les taxons¹ de Vertébrés, zone (ou membrane) pellucide (Mammifères), membrane vitelline (Sauropsidés, Amphibiens). Chez les Mammifères, c'est l'ovocyte qui est à l'origine de sa formation. Cette enveloppe joue un rôle primordial dans la reconnaissance zoospécifique des spermatozoïdes lors de la fécondation (voir § 4.2.2).

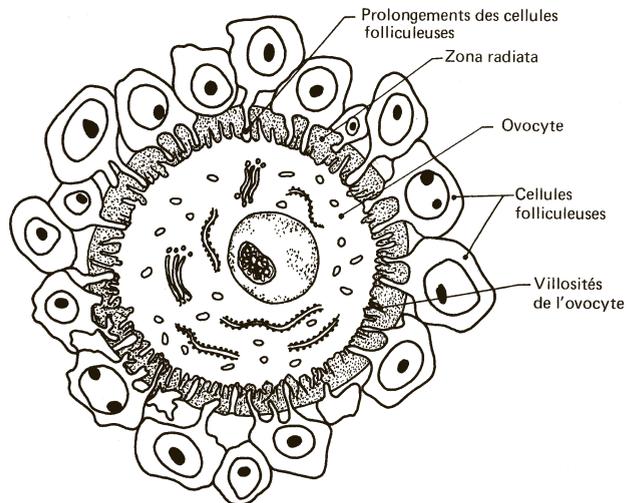


Figure 3.1 - Jeune ovocyte de Mammifère en relation avec le premier rang de cellules folliculeuses (d'après Anderson et Beams, 1960 modifié).

1. Le terme taxon désigne un ensemble concret dans la classification. Exemples : l'embranchement des Vertébrés, la classe des Oiseaux...

La membrane plasmique de l'ovocyte présente de nombreuses microvillosités ce qui accroît la surface de l'ovocyte (multipliée par 35 chez la grenouille) cependant que les cellules folliculeuses émettent des macrovillosités dont les extrémités restent en contact avec la membrane plasmique ovocytaire. Chez les Mammifères, l'interpénétration de ces formations villositaires persiste au cours de l'élaboration et de l'accroissement de la zone pellucide, conférant à cette dernière un aspect strié en microscopie photonique lui valant le terme de **zona radiata** (fig. 3.1). Les échanges et l'absorption par **micropino-cytose** de substances dissoutes en sont favorisés. Les contacts par les villosités permettent en outre le transfert de substances de haut poids moléculaire auxquelles les glycoprotéines de la zona radiata sont imperméables (protéines, polysaccharides).

b) Croissance des follicules chez les Mammifères (fig. 3.2, 3.3)

L'accroissement de taille des follicules qui arrivent successivement à maturité est dû surtout, chez les Mammifères vivipares, à la multiplication des cellules somatiques. Les ovocytes I qu'ils contiennent ne s'accroissent que faiblement par rapport à l'ovogonie (300 fois chez la souris), car les œufs de Mammifères vivipares sont alcécithes, c'est-à-dire dépourvus de réserves (voir § 5.1.1).

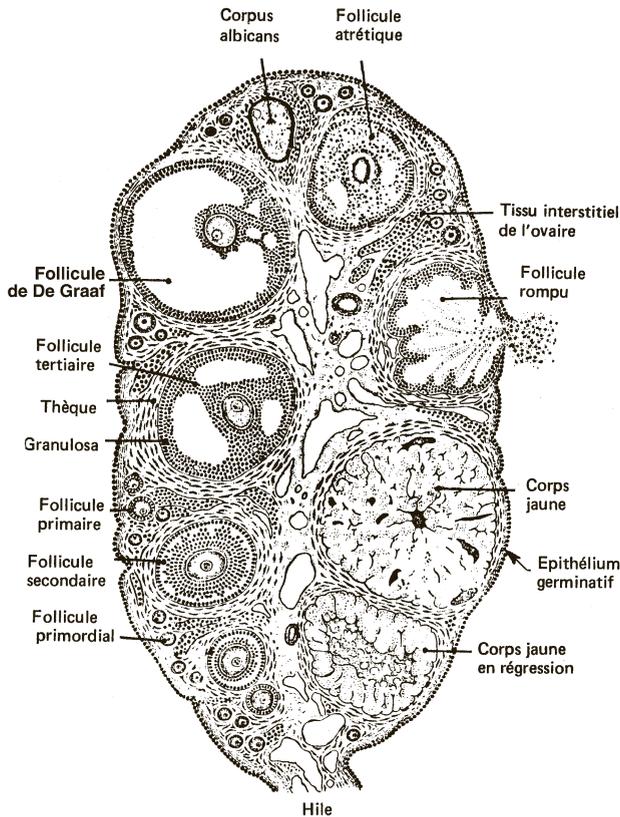


Figure 3.2 – Représentation théorique d'un ovaire de Mammifère où sont présentes toutes les étapes du cycle ovarien (d'après Turner, 1966).

La croissance des follicules est un phénomène continu. Chaque jour, de nouveaux follicules primordiaux entrent en croissance (15 par jour chez la femme de 20 ans, 1 chez celle de 40 ans). Ils sont pour la plupart condamnés à l'atrésie. La durée qui s'écoule entre cette reprise de croissance et l'ovulation est le **cycle ovarien** qui est propre à chaque espèce : 60 jours chez la femme, 21 chez la rate. Cette dynamique se traduit par la présence de follicules à tous les stades dans un ovaire (fig. 3.2), qui, chez les Mammifères vivipares est de « **type plein** » (voir § 17.1.5b).

- **Les follicules primordiaux (fig. 3.3A)**

Les ovocytes des ovaires embryonnaires, de petite taille, s'entourent des premières cellules folliculeuses en une mince couche aplatie, ces ensembles cellulaires constituant les follicules primordiaux qui se retrouvent en position périphérique dans l'ovaire mature.

- **Les follicules primaires (fig. 3.3B)**

Les cellules folliculeuses se multiplient et forment un épithélium unistratifié de cellules cubiques entouré d'une fine lame basale. L'ovocyte a augmenté de volume (environ 20 à 30 μ de diamètre) et son noyau est déjà au stade diplotène. Les premiers follicules primaires apparaissent vers l'époque de la naissance.

- **Les follicules secondaires (fig. 3.3C-D)**

La taille de l'ovocyte continue à s'accroître, atteignant 60 à 80 μ de diamètre, dans les follicules secondaires jeunes qui sont entourés de 2 à 3 rangées de cellules folliculeuses. Au total, le volume de l'ovocyte aura augmenté d'environ quelques centaines de fois suivant les espèces. Cette période correspond à des synthèses actives d'ARN, chez les Mammifères.

Dans les follicules plus âgés, la croissance de l'ovocyte est achevée et les synthèses sont très faibles; les cellules folliculeuses continuent de se multiplier. Croissance ovocytaire et multiplication des cellules folliculeuses sont corrélées dans la mesure où chacun des deux types cellulaires sécrète des facteurs de croissance, de la famille des TGF- β notamment, stimulant l'autre catégorie cellulaire. Les couches les plus internes, sont disposées de façon radiale autour de l'ovocyte et constituent la **corona radiata**. Des contacts persistent entre la membrane ovocytaire et les villosités issues de la première couche de cellules folliculeuses sous la forme de jonctions adhérentes et de jonctions communicantes. Les couches externes disposées moins régulièrement portent le nom de **granulosa**¹. Les cellules folliculeuses sont limitées extérieurement par une lame basale épaisse ou **membrane de Slavjanski**. Les tissus conjonctifs de l'ovaire forment à la périphérie une enveloppe supplémentaire qui se différencie en une **thèque interne** vascularisée par des capillaires reliés aux vaisseaux ovariens, et en une **thèque externe** formée de tissu conjonctif fibreux.

Des cellules sécrétrices d'hormones stéroïdes se différencient dans la thèque interne.

Tant que la puberté n'est pas atteinte, les follicules ne dépassent pas le stade secondaire, dégénèrent et deviennent atrésiques.

1. Nom donné au XVIII^e siècle à cause de l'aspect granuleux du tissu observé au microscope, ce qui était dû à la répartition désordonnée des noyaux

Partie 1 • Gamétogenèse et fécondation

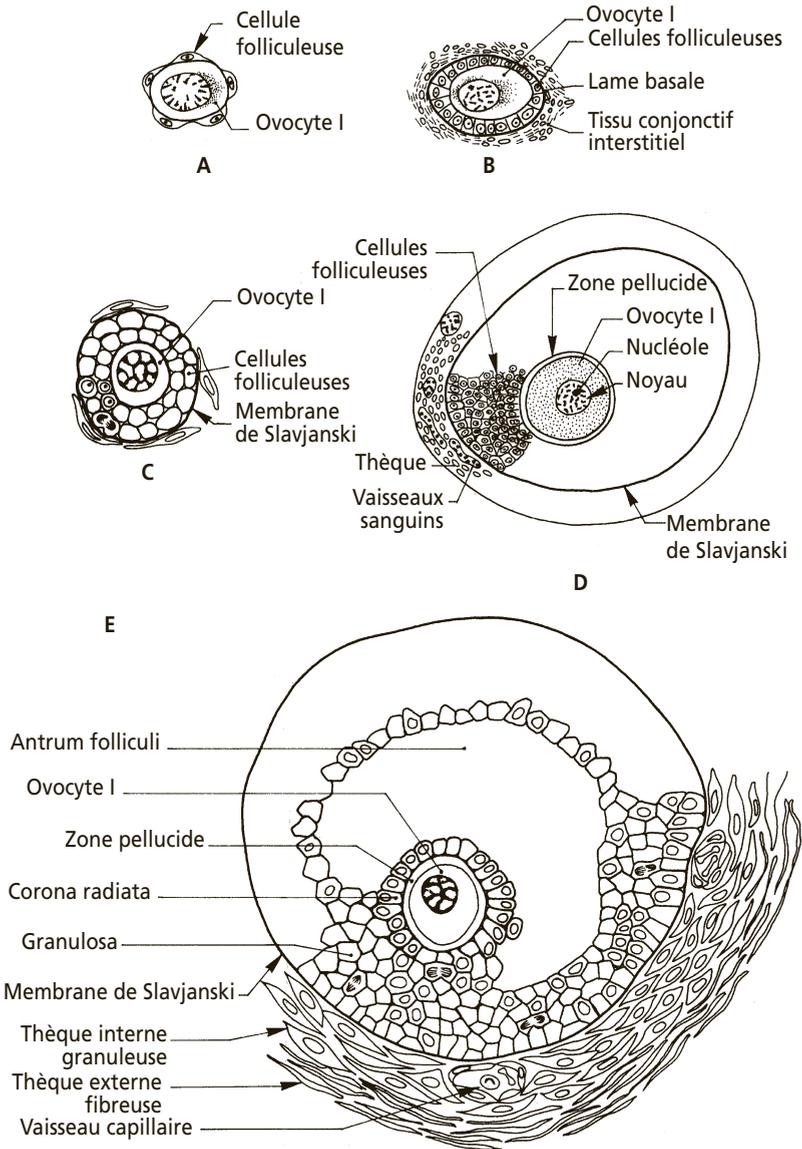


Figure 3.3 - Croissance d'un follicule ovarien de Mammifère.

A : Follicule primordial ; **B** : Follicule primaire ; **C** : Follicule secondaire jeune (2 couches de cellules folliculeuses) ; **D** : Follicule secondaire âgé ; **E** : Follicule tertiaire.

- *Les follicules tertiaires (ou cavitaires) (fig. 3.3E)*

Tout le long de la vie sexuelle, dès la puberté, un lot de follicules secondaires évolue en follicules tertiaires à chaque **cycle œstrien** (voir § 3.2). Quelques-uns atteindront l'ovulation (généralement un seul par cycle chez la femme), les autres dégénèrent à la suite de mécanismes de sélection, contrôlés par les hormones, qui seront vus plus

loin. Les traitements hormonaux peuvent dérégler ce mécanisme et favoriser des ovulations multiples. Il peut en résulter des fécondations multiples. Dans un follicule tertiaire, les cellules de la granulosa se multiplient tant que le follicule n'a pas atteint sa taille maximale. Une cavité se creuse dans la granulosa, résultant de la fusion d'espaces intercellulaires élargis, où s'accumule du sérum (la **liquor folliculi**) qui diffuse à partir des capillaires de la thèque interne. Ce sérum contient des hormones stéroïdes sécrétées par les cellules de la granulosa, essentiellement sous la forme d'**œstradiol**. Outre cette fonction stéroïdienne, les cellules folliculeuses synthétisent des protéines telles l'**inhibine** et l'**activine**.

- *Les follicules de De Graaf*

À la fin de la croissance folliculeuse, la cavité ou **antrum** occupe presque tout le volume du follicule. Un massif cellulaire fait saillie dans cet antrum, le **cumulus oophorus**, constitué par l'ovocyte I entouré par la zone pellucide et les quelques couches de cellules folliculeuses dont celles de la corona radiata. Le follicule mûr ou **follicule de De Graaf** a un aspect kystique et fait saillie à la surface de l'ovaire (fig. 3.2). Le noyau de l'ovocyte est en fin de stade diplotène. Les chromosomes se condensent et la diachinèse commence. À la maturation, la première division de méiose s'achève, avec émission du premier globule polaire; l'ovocyte est devenu un ovocyte secondaire ou **ovocyte II**. La seconde division de méiose s'arrête en métaphase (voir § 3.4.1). C'est alors que se produit l'ovulation vers le 14^e jour du cycle œstrien chez la femme.

- *Évolution des follicules ovariens après l'ovulation (fig. 3.2)*

L'ovulation survient à un stade précis du cycle ovarien sous le contrôle des hormones hypophysaires. Les parois du follicule et de l'ovaire s'amenuisent sous l'action d'enzymes, se déchirent, et l'ovocyte II entouré de sa corona radiata est expulsé par contraction du follicule et se trouve entraîné vers le pavillon de l'oviducte. Le follicule forme alors le **corps jaune** ou **corps progestatif**. Les cellules de la granulosa deviennent sécrétrices d'une nouvelle hormone stéroïde, la chaîne des synthèses hormonales s'arrêtant maintenant au niveau de la **progestérone**. Ce sont alors des **cellules lutéiniques**. Le corps jaune est irrigué par des capillaires provenant de la thèque interne. Celle-ci synthétise et sécrète toujours de l'œstradiol.

Quelques jours avant la fin du cycle ovarien, les activités de synthèse involuent, le corps jaune se résorbe et ne laisse qu'une trace cicatricielle ou **corpus albicans**. S'il y a eu fécondation et implantation du blastocyste, le corps progestatif se maintient pendant la gestation.

- *L'atrésie folliculeuse*

Peu de follicules primordiaux arrivent au terme de cette évolution, ils subissent pour la plupart une dégénérescence. La majorité des follicules primaires dégénèrent peu de temps après la naissance. Cette dégénérescence est aussi la règle pour tous les follicules qui croissent avant la puberté. Chez l'adulte, des follicules secondaires dégénèrent encore en cours de croissance ; ce type d'atrésie ne semble pas dépendre de l'action des hormones hypophysaires gonadotropes. Parmi les follicules qui parviennent à maturité, l'atrésie en élimine encore, plus de la moitié chez la femme. Cette atrésie tardive est par contre sous dépendance hormonale (voir § 3.2.1 et tableau 3.1).

c) Croissance du follicule ovarien des Amphibiens (fig. 3.4)

L'ovaire se présente sous la forme d'un sac à paroi épaisse délimitée par un épithélium ovarien externe et un épithélium ovarien interne. Dans cette paroi, les follicules se constituent autour d'ovocytes. Dans un même ovaire, on rencontre plusieurs générations d'ovocytes et des nids d'ovogonies. Les follicules en croissance font saillie à l'intérieur de la cavité ovarienne, ce type d'ovaire, dit de « **type creux** » est majoritairement représenté chez les Vertébrés, à l'exception des Mammifères vivipares¹ et des Poissons cartilagineux.

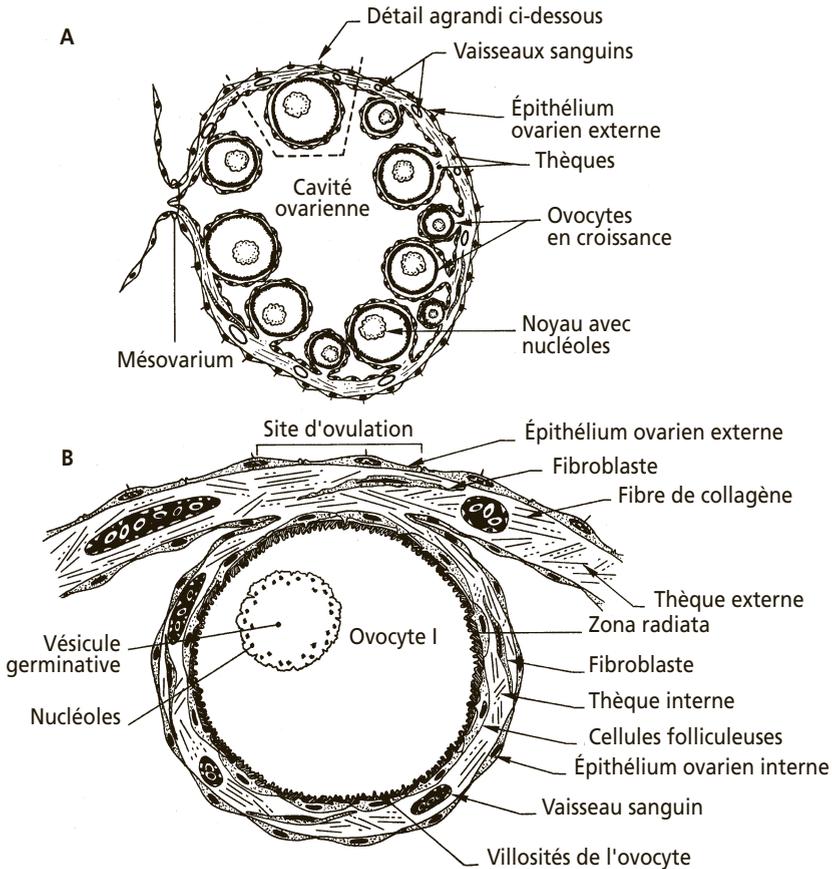


Figure 3.4 - Ovaire et follicule ovarien d'Amphibien (d'après Dumont et coll., 1978)

A. Ovaire schématisé avec ovocytes en croissance; B. Détail d'un follicule.

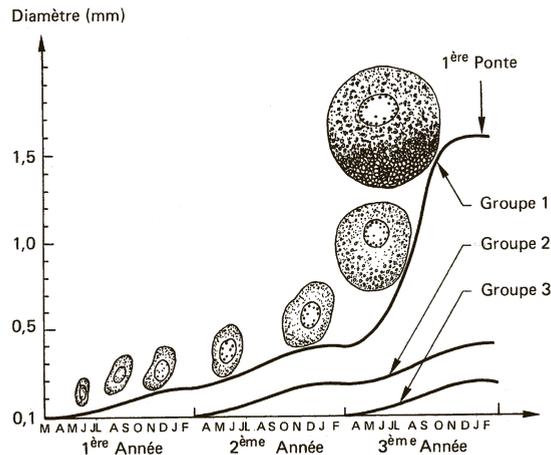
Dans un follicule, l'ovocyte est entouré par une seule couche de cellules folliculeuses, une thèque interne très vascularisée (c'est en effet par la circulation sanguine que sont apportées les substances utilisées pour la vitellogenèse) et par l'épithélium ovarien

1. Les Mammifères, ovipares ou Monotrèmes (Ornithorynques et Echidnés) ont des ovaires de type creux.

interne. La thèque externe s'étend sous l'épithélium ovarien externe et n'enveloppe pas complètement le follicule. Elle contient des vaisseaux plus importants qui se ramifient dans la thèque interne. La croissance de follicules provenant d'une même vague mitotique saisonnière est synchronisée. Les follicules ovariens chez les Amphibiens subissent une croissance importante à la fin de leur cycle, par accumulation de **vitellus** dans l'ovocyte pendant la fin de la phase diplotène. Celui-ci accroît son volume de 27 000 fois chez la grenouille. On distingue dans l'ovocyte une phase de petit accroissement qui dure environ 2 ans, c'est la **prévitellogenèse** et une phase de grand accroissement plus courte, inférieure à un an, c'est la phase de **vitellogenèse** (fig. 3.5).

Figure 3.5 - Croissance d'ovocytes de grenouille pendant les 3 premières années de la vie de la femelle.

Trois générations sont présentes simultanément. Le grand accroissement n'intervient que pendant la 3^e année (d'après Grant, 1953).



3.2 HORMONES SEXUELLES ET CONTRÔLE DE L'OVOGÈSE

Chez les Mammifères, la production des gamètes femelles est cyclique à la différence de ce qui se déroule au cours de la spermatogenèse. Cette activité peut être saisonnière chez certaines espèces (Carnivores) ou continue sur toute l'année pour d'autres (femme, rate, souris, truie...). L'activité cyclique ovarienne se manifeste sous la forme d'un **cycle œstrien** défini comme la durée entre deux **œstrus**. L'œstrus est le moment d'acceptation du mâle (période du rut), période qui correspond à la ponte ovulaire : c'est alors que la fécondabilité est maximale. La durée des cycles est variable selon les espèces (4-5 jours chez la rate, 17 jours chez la brebis...).

Chez certains Primates et en particulier dans l'espèce humaine, l'activité cyclique ovarienne s'accompagne de saignements périodiques dus à une dégénérescence et une élimination de la partie superficielle de la muqueuse utérine (période des règles ou **menstruation**). On désigne sous le terme de **cycle menstruel** la durée séparant deux de ces événements successifs, la période de la ponte ovulaire se situant au milieu de ce cycle.

Le contrôle hormonal de cette activité cyclique sera étudié ici chez la femme, dont les cycles durent 28 jours en moyenne et sont ininterrompus de la puberté à la ménopause.

3.2.1 Activités hormonales pendant la croissance du follicule ovarien des Mammifères (fig. 3.6 et 3.7)

a) Contrôle de l'activité hypophysaire par l'hypothalamus

Comme chez le mâle (voir § 2.5.1), l'hypothalamus constitue un centre neuroendocrinien qui contrôle l'activité hypophysaire en sécrétant une gonadolibérine, la GnRH. La sécrétion de cette hormone est cyclique chez la femelle des Mammifères. La périodicité de la stimulation correspond à la durée du cycle œstrien et constitue une caractéristique génétique. L'hypophyse antérieure ainsi stimulée sécrète les **gonadotrophines**, la FSH et la LH. Les cellules de la thèque interne et les cellules folliculeuses qui forment la granulosa sont les cibles respectives de la LH et de la FSH en raison de l'expression dans chacun de ces types cellulaires de récepteurs membranaires spécifiques à l'une ou l'autre de ces hormones. On verra néanmoins que l'action de la FSH sur les cellules folliculeuses y induit l'expression progressive de récepteurs à la LH au cours de la croissance du follicule.

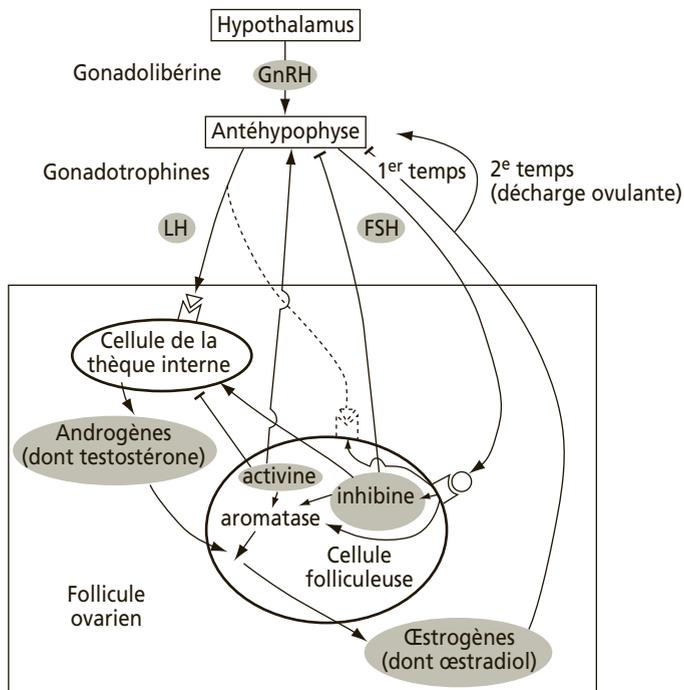


Figure 3.6 - Schéma des interactions hormonales durant la phase folliculeuse de l'ovogenèse.

Trois glandes sont impliquées : hypothalamus, antéhypophyse et follicule ovarien avec, dans ce dernier, les cellules folliculeuses et celles de la thèque interne. Les actions hormonales sont soit des activations (→) soit des inhibitions (←). Les figurés en tirets indiquent l'action progressive de la LH sur les cellules folliculeuses, suite à l'apparition de récepteurs sur leur membrane plasmique.

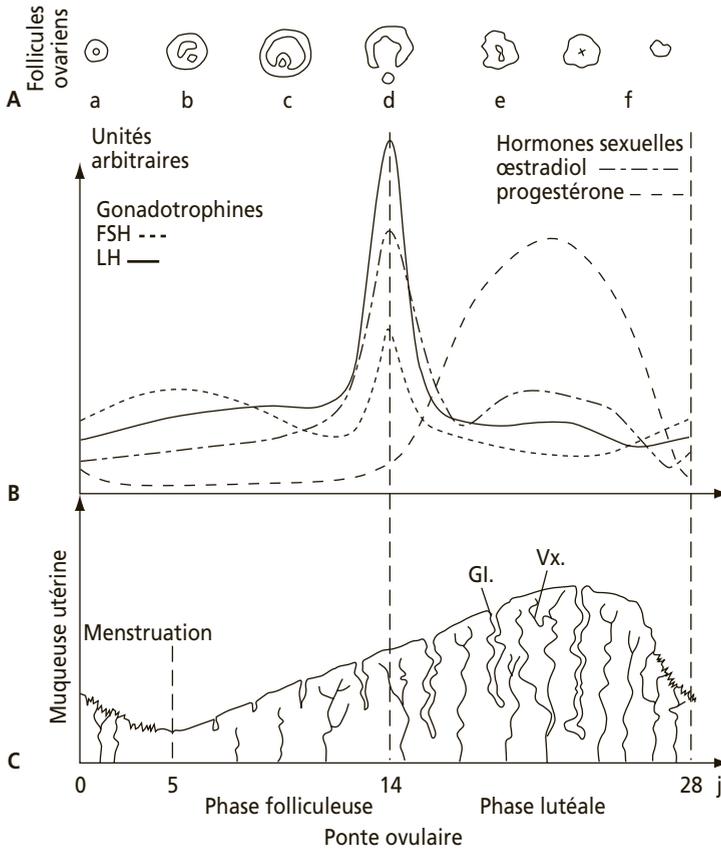


Figure 3.7 - Cycle menstruel chez la femme.

A : L'évolution d'un follicule est schématisée en haut de la figure. a : follicule secondaire — b : follicule tertiaire — c : follicule de De Graaf — d : ponte ovulaire — e : formation du corps jaune — f : involution du corps jaune.

B : Évolution des taux d'hormones hypophysaires et ovariennes. Les ordonnées représentent en unités arbitraires la concentration plasmatique des gonadotrophines hypophysaires et des hormones sexuelles stéroïdes.

C : Évolution de l'état de la muqueuse utérine entre deux menstruations. Noter son épaissement, le creusement des glandes tubuleuses (Gl) dans l'endomètre et le développement de la vascularisation (Vx).

b) Synthèses d'œstrogènes pendant la période pré-ovulatoire

Pendant la période pré-ovulatoire (ou phase folliculeuse), la synthèse des hormones stéroïdes sexuelles aboutissant à l'œstradiol débute dans les cellules de la thèque interne qui sécrètent des androgènes et s'achève dans les cellules de la granuloza qui les transforment en œstradiol.

L'**œstradiol** est l'hormone stéroïde sexuelle prédominante sécrétée par l'ovaire à cette période du cycle. Les précurseurs des œstrogènes (œstrone et œstradiol) sont, comme toutes les hormones stéroïdes, issus du cholestérol ; ce sont la prégnénolone, la progestérone et des androgènes dont la testostérone.



Les deux types de cellules stéroïdogènes présentes dans le follicule ovarien, celles de la thèque interne et celles de la granulosa, diffèrent non seulement par leurs récepteurs aux gonadotrophines, mais aussi par leurs équipements enzymatiques. Ces derniers comportent en particulier des cytochromes P450 spécifiques qui sont inégalement exprimés dans ces deux types cellulaires. Ainsi, les cellules de la thèque interne possèdent une 17 α -hydroxylase permettant d'obtenir des androgènes précurseurs des œstrogènes, à partir de la prégnénolone et de la progestérone, mais elles ne peuvent pas dépasser ce stade. Par contre, les cellules folliculeuses de la granulosa qui sont dépourvues de l'hydroxylase, possèdent une aromatasase qui permet la production d'œstrogènes à partir des molécules d'androgènes issues des cellules de la thèque interne.

c) Stimulation des synthèses d'hormones par les gonadotrophines hypophysaires

Durant la période pré-ovulatoire, les gonadotrophines hypophysaires stimulent la prolifération cellulaire, activent les enzymes de la stéroïdogénèse dans l'ovaire et stimulent la synthèse de l'inhibine et de l'activine.

Au début de la croissance du follicule, les récepteurs à la FSH des cellules folliculeuses sont devenus fonctionnels et l'hormone stimule la prolifération cellulaire et la formation de la granulosa.

- *La LH* provoque alors dans la thèque interne, la différenciation des cellules productrices des hormones androgènes que les cellules de la granulosa transformeront en œstrogènes. Elle stimule également le développement de la vascularisation de la thèque.
- *La FSH* contrôle, dans la granulosa, l'activité de l'aromatase responsable de la transformation des androgènes en œstrogènes. Elle induit la production d'inhibine α et la formation de récepteurs à la LH. Lorsque ceux-ci sont fonctionnels, la LH associée à la FSH, entraîne la formation d'inhibine β . L'action de la FSH est renforcée, chez la femme, par la présence de facteurs de croissance mitogènes du type IGF1 (pour « Insulin-like Growth Factor 1 ») produits par les cellules de la thèque.
- *L'activine* est synthétisée dans les cellules folliculeuses de la granulosa. Elle stimule la synthèse de FSH. Elle régule la production d'œstrogènes, soit positivement, en stimulant l'activité de l'aromatase dans les cellules folliculeuses soit négativement, en inhibant l'activité des cellules de la thèque productrices d'androgènes. On a montré enfin qu'*in vitro*, elle stimule la prolifération des cellules folliculeuses de rate en présence de FSH. L'activine est régulée par la follistatine qui l'inactive en s'y liant.

d) Hormones ovariennes et rétrocontrôles exercés sur la production des gonadotrophines

Dans la première phase du cycle œstrien, l'augmentation progressive du taux d'œstrogènes produits par les cellules folliculeuses va provoquer une inhibition en retour des sécrétions hypophysaires. Cette augmentation de la quantité d'œstrogènes a des effets régulateurs en stimulant la sécrétion d'inhibine qui, à son tour, inhibe la sécrétion de FSH. L'œstradiol à faible concentration inhibe également la sécrétion de LH, mais

stimulera celle-ci à forte concentration au moment de la ponte ovulaire. Ainsi ces inhibitions se traduisent, au niveau de l'hypophyse, par une rétention de LH et de FSH. Lorsque le taux d'œstrogènes plasmatiques atteint un certain seuil vers le 14^e jour du cycle, il se produit une libération brutale de LH, et à un degré moindre, de FSH, ce qui correspond à la **décharge gonadotrope ovulante** (voir fig. 3.6 et 3.7).

e) Régulation de la synthèse d'œstrogènes par la prolactine

La **prolactine (PRL)**, hormone hypophysaire sécrétée par les cellules lactotropes, régule également la synthèse d'œstrogènes. Cette hormone possède des effets qui s'expriment différenciellement selon les espèces en agissant sur la stéroïdogénèse ovarienne. Elle inhibe la synthèse d'androgènes à partir de la progestérone dans les cellules de la thèque et leur transformation en œstrogènes par les cellules de la granulosa. Cet effet est amplifié par l'œstradiol lui-même qui stimule la prolifération des cellules lactotropes et y active la transcription du gène de la prolactine.

f) Maturation sélective des follicules

Les mécanismes que nous venons de décrire n'aboutissent pas pour chaque follicule à la ponte d'un ovule mûr ; chaque cycle ovarien entraîne la croissance de quelques follicules mais très peu parviennent à la maturation finale.

- *Au cours d'un cycle ovarien, plusieurs poussées de croissance folliculeuse sont déclenchées par la FSH dont le taux varie au cours des cycles œstriens.* Elles se soldent pour la plupart par une dégénérescence des follicules. Seule la poussée se déroulant durant la fin de la phase folliculeuse aboutit à la maturation complète d'un ou plusieurs follicules et s'achève par la ponte ovulaire. Il s'opère un recrutement de follicules qui se développent en follicules tertiaires possédant un antrum où sont accumulées les sécrétions hormonales. Une sélection s'établit parmi eux de telle sorte que, à l'exception d'un ou de plusieurs, le nombre étant variable selon les espèces, la plupart dégénèrent (voir encart 3.1).



ENCART 3.1 La sélection des follicules

Ce sont les follicules les plus sensibles à la FSH qui parviennent à la maturation : la granulosa y est plus développée et les cellules de la thèque ayant plus de récepteurs à la LH, produisent plus de précurseurs pour la synthèse d'œstrogènes. Ceux-ci exercent une inhibition de la sécrétion de la FSH et augmentent par ailleurs le nombre de récepteurs sur les cellules folliculeuses. Un follicule en croissance voit donc son nombre de récepteurs et sa sensibilité à la FSH augmenter au moment où, par ses sécrétions d'œstrogènes, il contribue à abaisser le taux de FSH circulant. En fait, on connaît encore mal le mécanisme hormonal du choix d'un follicule appelé à devenir dominant cependant que les autres entrent en dégénérescence. Le follicule sélectionné se caractériserait par un seuil de sensibilité à la FSH plus bas et donc une sensibilité accrue à cette hormone. Les follicules appelés à disparaître par atresie montrent un arrêt de leur croissance, corrélativement à une disparition de leurs récepteurs hormonaux et une cessation de leurs synthèses.

● *La maturation du follicule de De Graaf et la ponte ovulaire sont contrôlées par les sécrétions hypophysaires et ovariennes.* Lorsque le follicule dominant, devenu follicule de De Graaf, a achevé sa maturation, sous le jeu du rétrocontrôle exercé par l'œstradiol qui devient positif, la LH et la FSH accumulées au niveau de l'antéhypophyse sont libérées. Les jonctions communicantes reliant les cellules de la granulosa et les cellules périovocytaires disparaissent. Les cellules folliculeuses entourant l'ovocyte produisent de l'hyaluronidase sous l'action de la FSH. Cette enzyme favorise la désorganisation de la matrice extra-cellulaire et entraîne la libération du cumulus oophorus dans l'antrum. Tant que les cellules de la granulosa n'étaient pas aptes à répondre à la décharge gonadotrope, elles exerçaient une inhibition sur la reprise de la méiose de l'ovocyte, bloquée au stade diplotène de la prophase I. Cette inhibition est levée (voir § 3.4.2) provoquant la rupture de la vésicule germinative et l'achèvement de la première division méiotique. L'ovocyte II ainsi formé s'engage dans la seconde division jusqu'au stade de la métaphase dans lequel il reste bloqué.

Une fragilisation des parois de l'ovaire et du follicule, à laquelle serait associée sous l'influence de la LH, la sécrétion de protéases ou de leurs activateurs (ex. : collagénase, activateur du plasminogène) et de prostaglandines, aboutit à leur rupture. L'ovocyte entouré de la zone pellucide et de la corona radiata est expulsé hors de l'ovaire. Le délai entre la décharge hormonale et la ponte ovulaire, variable selon les espèces, est de 36 heures chez la femme.

3.2.2 Activités hormonales après l'ovulation (fig. 3.7)

La période qui suit la ponte ovulaire jusqu'à la fin du cycle constitue la **phase lutéinique** dite encore lutéale. Elle débute par l'envahissement de la paroi du follicule vide par des capillaires sanguins. La FSH et la LH déclenchent une vague finale de mitoses dans ce qui reste de la granulosa; l'arrêt de la chaîne des synthèses d'hormones stéroïdes au niveau de la progestérone y est programmé. Les cellules folliculeuses ne se divisent plus, deviennent polyploïdes, hypertrophiées et chargées d'un pigment jaune : elles forment le **corps jaune** ou **corps progestatif**. On a montré en culture *in vitro* que la présence de l'ovocyte dans le follicule inhibe cette synthèse.

Le corps jaune, composé par des cellules dites **lutéales** correspondant aux anciennes cellules de la granulosa et à des cellules de la thèque interne qui se sont infiltrées, sécrète des hormones stéroïdes (de l'œstradiol et surtout de la progestérone) mais aussi des hormones peptidiques et des facteurs de croissance. Son maintien après l'ovulation est lié à la LH, pour laquelle une forte présence de récepteurs se manifeste à la surface des cellules lutéales. Plus tard, par un effet de retour, l'œstradiol et l'inhibine dépriment la synthèse de FSH, la progestérone déprime celle de LH, ce qui empêche le développement et la maturation complète de nouveaux follicules. En absence de fécondation, le corps jaune commence à régresser (**lutéolyse**) vers le dixième jour après la ponte ovulaire. Un facteur lutéolytique ovarien, la prostaglandine F2 α , intervient dans ce processus selon un mécanisme d'action encore mal connu. La sécrétion de progestérone et d'œstrogènes diminuant, leur action inhibitrice sur la production des gonadotrophines se lève progressivement, ce qui

permet la mise en place d'un nouveau cycle. Parallèlement, un tissu cicatriciel se développe au niveau du corps jaune et constitue le **corpus albicans**.

Si une fécondation a lieu, des facteurs embryonnaires empêchent la lutéolyse et permettent le maintien de la sécrétion de progestérone. Ce sont les cellules trophoblastiques du blastocyste qui, vers le 6^e jour après la fécondation correspondant à la période de la nidation environ, produisent une gonadotrophine à activité LH, la **hCG** (pour « **human Chorionic Gonadotropin** »), en quantité suffisamment importante pour empêcher la régression du corps jaune. La sécrétion d'hCG persiste pendant 2 mois, période au-delà de laquelle la production hormonale du corps jaune est alors relayée par la sécrétion placentaire de stéroïdes.

Une régulation hormonale analogue gouvernant la croissance et la maturation de l'ovocyte existe chez les autres Vertébrés.

3.2.3 Préparation de la muqueuse utérine par les hormones stéroïdes sexuelles

Au cours du cycle de 28 jours, la muqueuse utérine ou **endomètre** subit des modifications contrôlées par les hormones sexuelles (œstradiol et progestérone).

Au début d'un cycle correspondant à la **phase proliférative** ou **folliculeuse**, l'œstradiol stimule l'épaississement de la muqueuse, l'accroissement de son réseau de capillaires sanguins et l'apparition de glandes tubuleuses. À la fin de cette période se soldant par l'ovulation, les cellules deviennent sensibles à la progestérone. Sous l'action de cette hormone, durant la phase lutéinique, l'endomètre continue à s'épaissir et à développer sa vascularisation, les glandes tubuleuses s'allongent et deviennent sécrétrices, la muqueuse interne est prête pour la nidation¹. Si elle n'a pas lieu, les sécrétions du corps jaune cessent, la muqueuse involue, ce qui provoque les hémorragies menstruelles chez la femme et d'autres Primates.

3.3 SYNTHÈSES DANS L'OVOCYTE PENDANT L'OVOGÈNESE

Dans toutes les espèces étudiées, les ovocytes primaires, pendant la prophase de méiose et particulièrement pendant le stade diplotène, synthétisent activement des ARN qui sont conservés dans le cytoplasme sous une forme plus stable que dans les cellules somatiques. Une partie est utilisée pour les synthèses de protéines pendant l'ovogenèse. Le restant assure la synthèse des protéines au début de la segmentation, sans que la participation d'ARN provenant de la traduction des gènes paternels soit nécessaire. Bon nombre de ces ARN sont identifiés, et notamment ceux qui codent pour des protéines organisatrices du développement étudiées plus loin.

Les Amphibiens, la drosophile et les Mammifères sont pris pour modèles.

1. Un stéroïde synthétique, le mifépristone (RU486), en se liant au récepteur nucléaire de la progestérone, entre en compétition avec celle-ci et provoque l'inhibition de son action sur les gènes cibles des cellules utérines. Cet antiprogestatif, en empêchant la nidation, est utilisé à des fins d'IVG médicamenteuse.

3.3.1 Synthèses dans l'ovocyte d'Amphibiens

L'œuf de xénope est actuellement le mieux connu. De grande taille (env. 2 mm de diamètre), il est de type **hétérolécithe**, c'est-à-dire qu'il possède des réserves vitel- lines abondantes inégalement réparties dans le cytoplasme mais qui n'empêchent pas la segmentation totale.

La croissance de l'ovocyte s'étend sur environ 3 ans, entre la fin d'une multiplication d'ovogonies et la ponte ovulaire (fig. 3.5). Au cours des 2 premières années et au début de la troisième, la croissance est lente. Il s'accumule une population stable d'ARN-m et des protéines qui en sont la traduction. C'est la **phase de prévitellogenèse**. Dans la troisième année, la taille de l'ovocyte augmente considérablement par l'apport de molécules de réserve élaborées hors de l'ovaire et stockées dans les ovocytes, c'est la **phase de vitellogenèse**.

La durée de l'ovogenèse est variable d'une espèce à l'autre. Nous nous référons le plus souvent au xénope.

a) Les transcriptions au niveau des chromosomes en écouvillon

- *Structure du chromosome en écouvillon (fig. 3.8)*

Au stade diplotène, les chromosomes homologues appariés tendent à se séparer, n'étant plus réunis qu'au niveau des chiasma. Chaque chromosome contient 2 chromatides résultant de la duplication de l'ADN durant le stade préleptotène. Chez les Amphibiens, ces chromosomes ont une structure en **écouvillon** (en anglais « **lampbrush** »). Les 2 chromatides d'un même chromosome présentent une alternance de secteurs condensés et de boucles symétriques de tailles variées. Les premiers, les **chromomères**, sont de la chromatine non dés spiralisée où les gènes (ou les unités de transcription pouvant comporter plusieurs gènes) ne sont pas transcrits. Les **boucles**, d'environ 50 nm de longueur, sont des zones dés spiralisées correspondant à des unités de transcription transcrites pendant l'ovogenèse. Elles représentent 5 à 10 % de la longueur totale des chromosomes. La cartographie des chromosomes se retrouve identique d'un ovocyte à l'autre et reste stable dans le temps pour un même ovocyte, ce qui indique que la nature des séquences traduites est constante pour une espèce donnée pendant l'ovogenèse. On a pu identifier la nature des ARN transcrits sur certaines boucles et ainsi commencer la cartographie de ces chromosomes.

- *Mise en évidence d'une synthèse d'ARN au niveau des boucles*

La microscopie électronique permet d'observer des molécules d'**ARN natif**, c'est-à-dire en cours de transcription, ainsi que les **ARN polymérasés** qui catalysent leur élongation à la racine de chaque brin. On observe sur des préparations pour la microscopie électronique où la chromatine isolée est étalée et contrastée, une ou plusieurs séries de brins d'ARN de taille croissante le long d'une boucle, suivant que la boucle comporte un ou plusieurs gènes transcrits simultanément. Ces ARN sont immédiatement combinés à des protéines stabilisantes pour former des ribonucléo- protéines qui forment une matrice autour des boucles (fig. 3.8).



Si de l'uridine ^3H est injectée à la femelle, une forte radioactivité se détecte au niveau de ces boucles où le nucléotide a été incorporé dans les ARN natifs. Le marquage reste stable dans la matrice jusqu'à 2 semaines.

La densité en brins d'ARN transcrits et en ARN polymérase n'est pas constante pendant toute l'ovogenèse. Dans les ovocytes jeunes, en prévitellogenèse, les ARN polymérase et les brins en cours d'élongation sont 5 à 10 fois plus espacés que pendant la vitellogenèse, ce qui signifie que le taux de transcription s'est accéléré pendant cette dernière période. Le rapport de la quantité d'ARN/quantité d'ADN, est de 9 pendant l'ovogenèse, soit 145 fois plus que dans la chromatine de noyaux somatiques comme les cellules du foie. Ceci confirme une très forte activité de synthèse. Lorsque l'œuf est mûr, les boucles sont moins étendues, mais les unités de transcription persistent, quoique peu visibles (voir aussi encart 3.2).

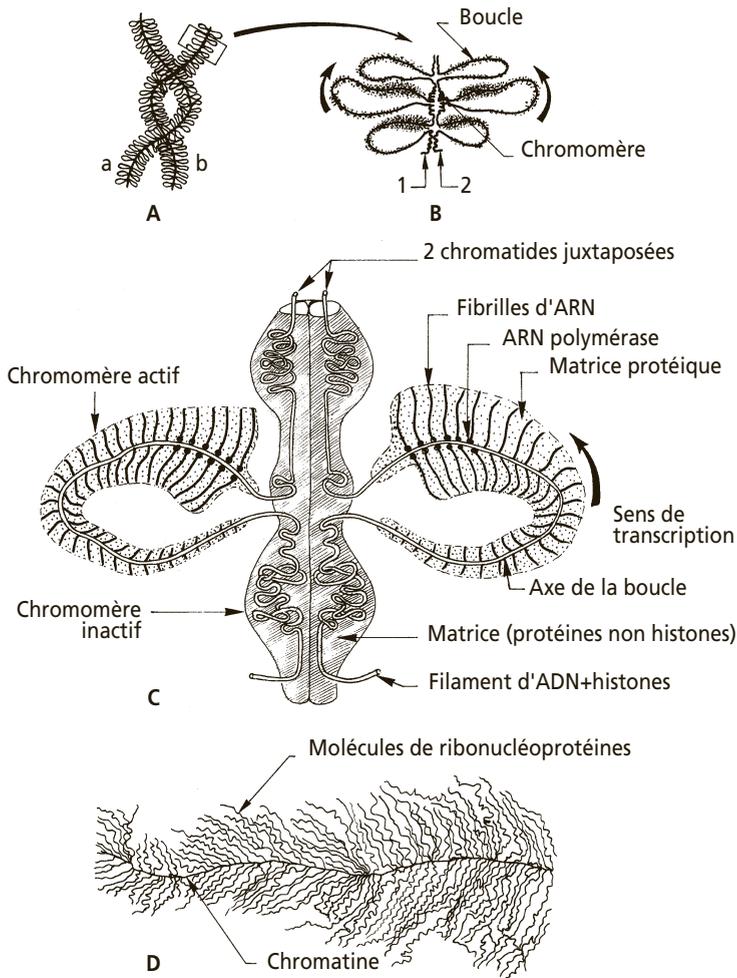


Figure 3.8 - Chromosomes en écouvillon dans un ovocyte d'Amphibiens

A : Schéma de chromosomes homologues appariés (a-b). **B** : Détail : chaque chromosome comprend deux chromatides (1) (2). Elles sont tantôt condensées en chromomères inactifs, tantôt étendues en boucles (chromomères actifs), entourées d'une matrice. Les flèches représentent le sens de transcription. **C** : Détail d'une boucle (d'après Lacroix). **D** : Détail d'une boucle d'après une observation en microscopie électronique. Le sens de transcription va de gauche à droite.

b) ARN nucléaires pré-messagers et ARN messagers – leur stabilité

De l'ensemble des ARN synthétisés dans le noyau, seule une faible part forme des ARN-m fonctionnels au niveau cytoplasmique. Ceux-ci s'accumulent pendant la prévitellogénèse mais se dégradent rapidement pendant la phase finale de la vitellogénèse, ce qui entraîne des synthèses intenses pour assurer leur renouvellement.



3.2 Évaluation des ARN synthétisés

Une forte proportion de molécules d'ARN de poids moléculaire élevé ne forme pas d'ARN-m directement opérationnels. Lors du passage des molécules de pré-messagers du noyau vers le cytoplasme, se produisent l'excision des introns et l'épissage des exons ; les premiers étant en quantité nettement plus importante que les exons, les molécules d'ARN-m sont nettement plus courtes. Chez le xénope ce ne sont que 11% de ces séquences d'ARN dans l'ovocyte en croissance (5% dans les ovocytes mûrs) qui passent dans le cytoplasme. Cette population d'ARN cytoplasmiques de coefficient de sédimentation 4S à 40S est relativement stable; elle est **polyadénylée**^a. Cependant, par le jeu des excisions et des épissages alternatifs, à partir d'une même séquence de pré-messager, peut être élaborée une grande diversité d'ARN-m dont la traduction fournit une famille de protéines apparentées, aux fonctions variées.

On a calculé que, pendant la phase d'activité des chromosomes en écouvillon, l'activité de transcription était 1 000 fois plus élevée dans le noyau de l'ovocyte (avec 4 compléments d'ADN) que dans les cellules de gastrula âgée (avec seulement 2 compléments d'ADN). Cette activité est due à la densité en ARN polymérase qu'on peut observer sur les boucles et qui transcrivent en série la même unité de transcription. Le taux de passage dans le cytoplasme des transcrits stables est aussi 1 000 fois plus élevé que dans d'autres cellules.

Cependant il existe aussi des molécules de pré-messagers qui passent dans le cytoplasme sans maturation. Elles sont polyadénylées également, mais sont, en l'état, intraduisibles, puisque les introns n'ont pas été éliminés. On ignore la signification du phénomène.

^a Un ARN polyadénylé (poly-A) contient à son extrémité 3' une séquence d'acide polyadénylique, c'est-à-dire une suite de ribonucléotides dont la base azotée est l'adénine. La polyadénylation est un caractère stabilisant de la plupart des ARN-m.

Pendant la prévitellogénèse, les ARN-m poly(A) s'accumulent jusqu'à atteindre un plateau de concentration quatre fois plus élevé au début de la vitellogénèse (Golden et coll., 1980). Il est ainsi montré que la quantité d'ARN-m poly(A) par ovocyte reste constante depuis la fin de la prévitellogénèse, malgré une activité de transcription intense observée sur les chromosomes en écouvillon pendant la vitellogénèse qui suit.

Ces ARN-m sont stables, leur demi-durée de vie est de 35 jours environ, ce qui explique qu'auparavant on n'ait pas détecté aisément leur dégradation, dans d'autres conditions expérimentales.



Une quantité totale de 80 ng (10^{-9} g.) par ovocyte est atteinte à la fin de la prévitellogenèse. Son maintien, au rythme de renouvellement d'une demi-durée de vie de 35 jours nécessite une activité de transcription intense. On a calculé que, pour maintenir constant le niveau des produits d'un gène qui a été transcrit activement à 4 exemplaires, sur 4 chromatides pendant la prévitellogenèse, 44 copies par minute étaient nécessaires (11×4) pendant la vitellogenèse. Cela signifie le départ d'une transcription toutes les 5 à 6 secondes, ce qui explique la densité des transcrits et des ARN polymérase sur une boucle de chromosome en écouvillon; c'est là que se retrouvent 2 jours plus tard, 90% de la radioactivité après injection d'uridine ^3H dans les ovocytes en fin de croissance.

Il semblerait donc qu'en fin de croissance les ARN synthétisés ne feraient qu'assurer le **renouvellement** de la quantité totale qui s'était formée pendant la prévitellogenèse.

c) ARN de transfert – ARN ribosomiques

Parmi les produits de transcription se trouvent aussi les ARN de transfert, les ARN 5S ribosomiques et les ARN précurseurs ribosomiques 40S¹. Ces derniers sont transcrits au niveau nucléolaire.

- *Les ARN de transfert.* Ils sont synthétisés tout le long de l'ovogenèse et sont utilisés pendant la segmentation. Un œuf mûr en contient 60 000 fois plus qu'une cellule somatique.

- *Les ARN ribosomiques 5S.* Ils sont transcrits à partir de gènes très redondants² (20 000 gènes environ) localisés sur plusieurs chromosomes. Cette activité, maximale dans le jeune ovocyte, se maintient de la prévitellogenèse à l'œuf mûr (fig. 3.9).

Ces ARN très stables vont s'accumuler dans le cytoplasme en particules ribonucléoprotéiques 42S, dont une catégorie contient en outre des ARN de transfert 4S. Ce sont des particules qui donnent au cytoplasme des jeunes ovocytes leur forte affinité pour les colorants histologiques basophiles. Il existe en fait des ARN 5S ovocytaires et des ARN 5S somatiques, ces derniers apparaissent plus tardivement.

- *Les ARN ribosomiques nucléolaires.* La quantité de ribosomes présente dans un ovocyte mûr (10^{12}) est telle qu'on a calculé qu'il faudrait à une cellule normale près de 100 ans pour transcrire les ARN qui s'y trouvent. En réalité, les composants 18S, 28S et 5,8S de ces ARN sont transcrits en majorité dans les 6 derniers mois de l'ovogenèse. Ces constatations ne sont pas contradictoires. Il se greffe un phénomène préalable durant le stade pachytène de l'ovogenèse de certaines espèces (Amphibiens, Poissons osseux, certains Insectes) : **l'amplification des organisateurs nucléolaires** qui rend possible ultérieurement une transcription accélérée des ARN 18S, 28S et 5,8S.

- *Amplification des organisateurs nucléolaires.* La réplication de l'ADN cesse dans les ovocytes au stade préleptotène. Cependant, au stade pachytène, on assiste chez les Amphibiens, certains Poissons et certains Insectes, à une réplication intense de l'ADN au niveau des gènes qui constituent les organisateurs nucléolaires.

1. ARN précurseur ribosomique 40S chez les Amphibiens, 45S chez les Mammifères.

2. Gène redondant : gène qui se répète plusieurs fois de suite le long d'un brin d'ADN.

Partie 1 • Gamétogenèse et fécondation

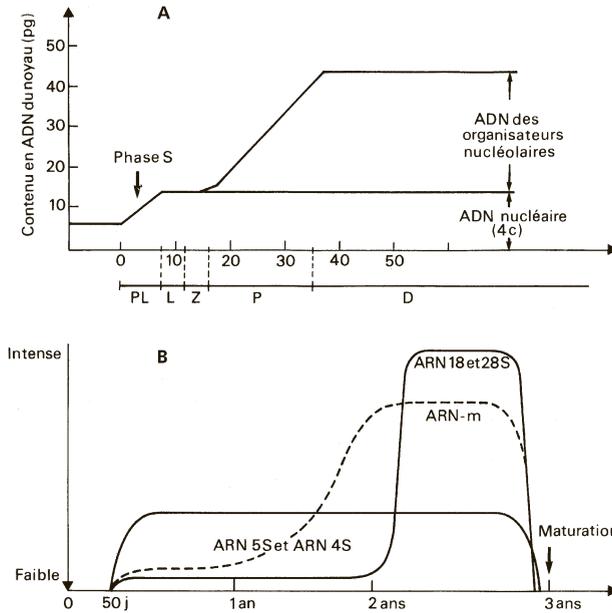


Figure 3.9 - Récapitulation des synthèses d'acides nucléiques pendant l'ovogenèse (ARN et ADN mitochondriaux n'ont pas été pris en compte).

A : Chronologie de la prophase I de méiose dans les premiers jours de l'ovogenèse, où sont précisées les périodes de duplication de l'ADN chromosomique, des organisateurs nucléolaires et les quantités d'ADN synthétisées. PL : préleptotène, L : leptotène, Z : zygotène, P : pachytène, D : diplotène. **B** : Diagramme des synthèses d'ARN pendant la prévitellogenèse et la vitellogenèse (Les ordonnées ne correspondent pas à des valeurs chiffrées.)

Chez les Amphibiens, une cellule somatique possède un organisateur nucléolaire par génome haploïde. C'est une suite répétitive d'environ 500 gènes identiques codant pour des ARN 40S (précurseurs des ARN ribosomiques autres que l'ARNr 5S) et séparés par des espaceurs non transcrits. Il y a donc dans une cellule diploïde normale 2 fois cette séquence, soit environ 1 000 gènes.

Dans l'ovocyte des Amphibiens, ces organisateurs sont « polycopiés » un certain nombre de fois au stade pachytène, de telle sorte qu'à la fin du processus, les noyaux ovocytaires contiennent suivant les ovocytes, 500, 1 000 ou 2 000 organisateurs surnuméraires. Cette duplication répétée est strictement localisée au niveau des organisateurs. La quantité d'ADN des organisateurs nucléolaires est importante. Sur les 42 pg (10^{-12} g) d'ADN contenus dans le noyau d'un ovocyte de xénope, 30 pg sont de l'ADN nucléolaire.

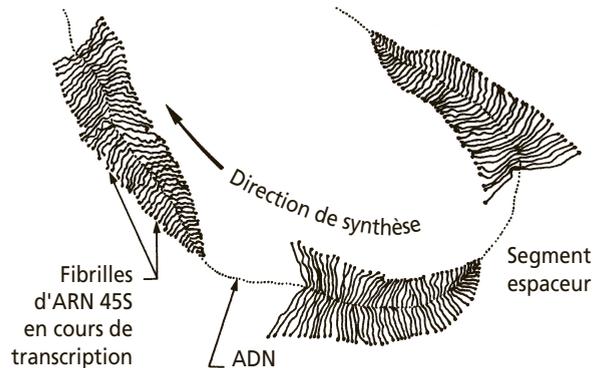
- **Synthèses des ARN ribosomiques nucléolaires.** 3 catégories d'ARN ribosomiques dérivent d'un même précurseur 40S, transcrit par un organisateur nucléolaire. Ils sont associés aux protéines de la grande et de la petite sous-unité ribosomique au niveau du nucléole. C'est là que vient également s'insérer, dans la grande sous-unité,

l'ARN ribosomique 5S, mentionné plus haut. Au début du stade diplotène, les organisateurs nucléolaires néoformés se dispersent à la périphérie du noyau, deviennent actifs et sont à l'origine des nucléoles surnuméraires. Les 2 nucléoles normaux subsistent également.

C'est sur les nucléoles des ovocytes d'Amphibiens que Miller (1969) a montré pour la première fois en microscopie électronique des molécules d'ARN en cours de transcription (fig. 3.10)¹.

Pendant le petit accroissement de l'ovocyte (prévitellogenèse), les synthèses d'ARN 40S sont faibles, les brins d'ARN transcrits sont espacés sur les organisateurs. Les synthèses s'accroissent considérablement pendant la vitellogenèse (fig. 3.9). Les histo-autoradiographies montrent alors que la radioactivité des nucléoles est 60 fois plus importante que celle des boucles de chromosomes en écouvillon. Pendant un temps relativement court de quelques mois, l'ovocyte va synthétiser autant d'ARN nucléolaires qu'en synthétiserait une cellule ordinaire en de nombreuses années. Associés à des ARN ribosomiques 5S et à des protéines, ces ARN nucléolaires vont contribuer à former une réserve de ribosomes pour le début de la vie embryonnaire. L'assemblage des ribosomes se fait dans les nucléoles pendant le grand accroissement de l'ovocyte.

Figure 3.10 - Détail d'un organisateur nucléolaire d'ovocyte d'Amphibien synthétisant des ARN nucléolaires. (Une molécule entière d'ADN de l'organisateur nucléolaire forme une boucle fermée). Ici, 3 gènes codant pour le précurseur 40S, séparés par deux espaceurs. (d'après Miller, 1971).



d) Activité des ARN traduits pendant l'ovogenèse : synthèse et stockage de protéines

Pendant la croissance de l'ovocyte, la synthèse des protéines augmente. Par exemple, chez le xénope, cette augmentation est de 127 fois. Il ne s'agit pas d'un accroissement de la vitesse de traduction des mêmes ARN, mais de l'incorporation croissante de nouveaux ARN-m dans les polyribosomes, donc d'une diversification croissante des protéines synthétisées. Elles continuent d'ailleurs à l'être après la fécondation. Cette synthèse active n'implique cependant que le cinquième des ARN totaux (4 ng).

1. Un terme imagé est parfois utilisé pour désigner l'aspect observé, celui d'« arbres de Noël ».

- *Protéines intervenant dans la maturation de l'œuf et dans la fécondation*

Ce sont des facteurs qui contrôlent l'achèvement de la méiose, comme le facteur promoteur de la maturation, le facteur cytotatique, (voir § 3.4.2) ou des récepteurs de la membrane ovocytaire permettant la rencontre des gamètes.

- *Protéines organisatrices des premiers stades du développement*

Dès la fécondation et le début de la segmentation, l'acquisition de la polarité de l'œuf, la détermination des territoires et les premières inductions avant la transition blastulienne, résultent de l'activité de protéines (facteurs de croissance, facteurs de transcription) dont la synthèse a débuté pendant l'ovogenèse (voir chap. 12 et 14). La cohésion cellulaire est assurée par des protéines d'adhérence cellulaire (voir §13.2.2). Par ailleurs, des protéines matricielles comme la fibronectine, nécessaires au moment de la gastrulation, sont déjà synthétisées dans l'ovocyte (voir § 13.4.1a et 13.4.4).

- *Protéines nécessaires aux divisions cellulaires ou à la traduction des ARN-m*

Les mitoses se succédant à un rythme rapide et les synthèses de protéines étant très actives, il est nécessaire que l'embryon puisse utiliser, pendant la segmentation, des protéines synthétisées d'avance pendant l'ovogenèse et stockées dans l'œuf. On citera à titre d'exemple :

- Les **histones**, constituants de la chromatine, produites pendant l'ovogenèse à partir de gènes répétitifs (environ 40 chez le xénope), se trouvent en quantité suffisante pour former la chromatine de 20 000 cellules ; elles s'ajoutent au cours de la segmentation aux histones synthétisées dans les blastomères en division.
- Les **tubulines**, constituants des microtubules, notamment des fuseaux mitotiques, forment une part importante des protéines non vitellines de l'œuf mûr.
- Les **protéines ribosomiques** qui entrent dans la composition des ribosomes.
- Les **ADN-polymérase synthétisées pendant l'ovogenèse**, surtout à la maturation, ont une activité enzymatique égale à celle d'une gastrula âgée (10^5 cellules), ce qui signifie que l'ovocyte a accumulé une quantité d'enzymes équivalant au contenu de milliers de cellules somatiques.
- Les **ARN-polymérase** dont la quantité accumulée pendant l'ovogenèse est telle que l'activité enzymatique d'une seule vésicule germinative d'Amphibien est égale à celle de la totalité des ARN-polymérase d'un têtard de 400 000 cellules.

e) ARN non fonctionnels de l'ovocyte. Leur stabilité

- *Stabilité de la population d'ARN-m*

Il y a environ 21 ng d'ARN-m à la fin de l'ovogenèse, dont 80 % ne sont pas traduits à ce moment. Cette quantité n'a pas diminué à la fécondation et se retrouve dans la blastula. La population d'ARN-m est donc stable. Nous avons vu qu'elle a atteint son maximum au début de la vitellogenèse et se renouvelle ensuite régulièrement suivant une rotation lente (demi-durée de vie de 35 jours), mais qui réclame cependant une grande activité de transcription.

Les mécanismes qui empêchent la traduction de ces ARN-m (voir chap. 4) contribuent aussi à assurer leur stabilité.

Le milieu cytoplasmique de l'ovocyte est stabilisant pour les ARN-m, cette stabilité se maintient au début du développement embryonnaire.

- *Stabilité des ribosomes et des ARN ribosomiques*

Les ribosomes accumulés pendant l'ovogenèse sont stables et suffisent à assurer la traduction des messagers jusqu'à un stade avancé du développement (bourgeon caudal). Des ARN-r nouveaux, transcrits à partir du génome de l'embryon, n'apparaissent qu'à la mi-blastula (voir § 12.6) et le relais fonctionnel des nouveaux ribosomes n'est assuré que progressivement.

- *Mécanismes de neutralisation des ARN-m non fonctionnels dans l'ovocyte*

80 % des ARN-m de l'ovocyte mûr ne sont pas traduits pendant l'ovogenèse. Or ces ARN, après extraction, peuvent être traduits *in vitro* dans un système acellulaire, ou *in vivo* après injection dans un autre ovocyte en croissance. Il existe plusieurs mécanismes possibles qui expliqueraient cette neutralisation (voir § 4.5.2e).

- *Distribution des ARN-m dans le cytoplasme ovocytaire*

On a montré que la distribution régionalisée des ARN-m dans le cytoplasme d'une cellule conduit, après traduction, à des localisations spécifiques de protéines qui sont à l'origine d'asymétries fonctionnelles cellulaires. Dans l'ovocyte, la répartition différentielle d'ARN-m et/ou de protéines confère à ces derniers des rôles de **déterminants cytoplasmiques** qui conditionneront notamment le devenir individuel des cellules de l'embryon en formation. Il est aisé de comprendre que dès les premières divisions de l'œuf, les cellules filles diffèrent par leurs potentialités de synthèse (King et Barklis, 1985).

Certains ARN-m transcrits précocement sont cantonnés immédiatement en des sites bien définis du cytoplasme. On citera plusieurs exemples : des ARN localisés dès le début de l'ovogenèse dans le nuage mitochondrial, qui sont des constituants du plasmogerminal (voir § 17.1.2a) ; des ARN-m codant pour des déterminants cytoplasmiques, qui se localisent dans l'ensemble de l'embryon en s'y accumulant après la fécondation (voir § 12.5.8) ; les ARN-m codant pour VegT, une protéine-clé de la détermination de l'endoderme, localisés dans le cortex végétatif dès le début de la vitellogenèse (voir § 12.5.5). On pourrait allonger cette liste en incluant une grande partie des ARN qui contrôlent le développement jusqu'à la transition blastulienne.

À l'inverse, certains ARN-m présentent une distribution initiale homogène dans l'ovocyte immature et ne se localisent qu'ensuite dans une région spécifique de l'œuf mature. C'est le cas de l'ARN-m codant pour la protéine Vgl, qui joue un rôle prédominant dans l'induction du mésoderme dorsal (voir § 12.5.8b). Par hybridation *in situ* utilisant des sondes radioactives d'ARN complémentaire, la distribution dynamique de cet ARN a pu être suivie et a permis d'observer sa localisation progressive dans le cortex végétatif, site qu'il occupe au moment de la maturation de l'ovocyte.



Les localisations ciblées des ARN-m sont attribuées à l'existence de signaux spécifiques. Des séquences nucléotidiques situées dans les régions non traduites à l'extrémité 3' des ARN-m (3'-UTR pour « 3'-untranslated région ») paraissent directement impliquées dans ce processus. Ainsi des ARN-m de Vgl injectés dans un ovocyte se localisent correctement au pôle végétatif, indépendamment de toute traduction et il a été montré qu'une séquence de 340 nucléotides située dans la 3'-UTR, qui comporte 1 300 nucléotides, est directement associée à cette localisation privilégiée. De plus, des facteurs cytoplasmiques encore mal caractérisés doivent interagir avec le signal porté en 3'-UTR (6 protéines au moins semblent capables de se lier avec la région non traduite de Vg1). Les ARN-m associés à ces facteurs forment des ribonucléoprotéines qui interagissent avec les éléments du cytosquelette. On a en effet reconnu que celui-ci est impliqué à la fois dans la mobilité et l'ancrage des ARN-m localisés. Selon les types d'ARN-m et les stades dynamiques de la localisation, l'un des 3 systèmes cytosquelettiques peut jouer un rôle. Ainsi le transport des ARN-m de Vgl au pôle végétatif nécessite l'intégrité du système microtubulaire cependant que l'ancrage de ces mêmes transcrits requiert un système de microfilaments intact. En revanche les ARN-m de Xcat-2 jouant, semble-t-il, un rôle dans la détermination germinale, seraient liés au système des filaments intermédiaires.

L'attention portée à ces mécanismes montre que ceux-ci sont fondamentaux pour les étapes de la morphogenèse et sont observés de façon générale dans tous les modes de développement (voir § 3.5.4 à propos de l'ovogenèse des Insectes).

f) Vitellogenèse et accumulation du vitellus

Sous le terme ancien de **vitellus** se regroupent des substances de réserve diverses. On distingue, apparaissant le premier, un vitellus glucidique (glycogène), puis un vitellus lipidique (graisses, phospholipides) et un vitellus protéique (protéines et phosphoprotéines).

Le vitellus n'est pas synthétisé dans l'ovocyte. Les protéines et les phosphoprotéines sont élaborées dans le foie maternel. Elles sont amenées par la circulation sanguine et la vascularisation de la thèque interne.

Le vitellus protéique, chez les Amphibiens, est organisé en inclusions, les plaquettes vitellines, formées de **phosvitine**, protéine hautement phosphorylée et de **lipovitel-line**, contenant une forte proportion de lipides liés. Ces 2 protéines sont dérivées d'un précurseur commun de 470 kDa, la **vitellogénine**. Leurs molécules sont organisées en un réseau cristallin observable en microscopie électronique.

La vitellogénine est synthétisée sous le contrôle d'œstrogènes sécrétés par les cellules folliculeuses, qui stimulent dans le foie la synthèse des ARN-m correspondants et leur traduction.

La phosvitine, un des dérivés de la vitellogénine, est soluble dans l'eau parce qu'incomplètement phosphorylée. Après pénétration dans l'ovocyte, la phosphorylation s'achève, insolubilisant la phosvitine et les plaquettes vitellines se forment au voisinage des mitochondries où cette réaction s'est déroulée.

Outre leur rôle hormonal indiqué plus haut, les cellules folliculeuses jouent un rôle dans le transit des éléments de vitellus prélevés dans le sang ; elles contribuent aussi à l'élaboration des molécules vitellines qui sont ensuite émises dans l'espace périovocytaire et absorbées dans l'ovocyte par micropinocytose.

C'est pendant la vitellogenèse que l'organisation du cytoplasme de l'ovocyte s'achève : les granules corticaux (voir § 3.4.1 et 3.6.1), d'abord dispersés, migrent à la périphérie de l'ovocyte. Les mitochondries se multiplient abondamment (il ne s'en formera pas de nouvelles avant la gastrulation) et se localisent à la périphérie de l'ovocyte. Chez les Amphibiens, le vitellus se dépose selon un gradient de concentration croissante du pôle animal vers le pôle végétatif (œufs **hétérolécithes**).

En résumé

Pendant l'ovogenèse des Amphibiens, la synthèse d'informations sous la forme d'ARN-m en quantité suffisante pour un développement très rapide est assurée.

La structure des chromosomes en écouvillon permet la transcription d'une quantité d'ARN qui atteint un niveau qui reste stable jusqu'à la fin de l'ovogenèse. Cette stabilité est acquise grâce à un renouvellement lent des molécules dégradées pour lequel une activité maximale de transcription reste cependant nécessaire.

En fin de croissance, il s'accumule un lot de protéines nécessaires à une multiplication cellulaire rapide ainsi qu'à la détermination précoce de territoires embryonnaires.

Un stock considérable d'ARN ribosomiques nucléolaires, ainsi que 5S, ne peut être accumulé dans les délais nécessaires que par un processus annexe d'amplification des organisateurs nucléolaires.

3.3.2 Synthèses dans l'ovocyte de Mammifères

Il n'y a pas de vitellogenèse chez les Mammifères Euthériens (voir encart 3.3). Leurs œufs sont **alécithes**, c'est-à-dire dépourvus de réserves vitellines. Leur période de croissance ovocytaire s'étend sur les semaines qui précèdent la ponte (2 chez les souris).



ENCART 3.3 Signification biologique des synthèses ovocytaires

Les synthèses d'ARN chez les Mammifères ressembleraient à ce qui est observé pendant la prévitellogenèse des Amphibiens. Au point de vue évolutif, la phase de vitellogenèse n'a pas lieu d'être chez les Mammifères Euthériens qui, très vite, établissent des liens trophiques avec la mère. Les besoins ne sont pas les mêmes que chez les Amphibiens. L'environnement nutritif dispense de la vitellogenèse. Le trophoblaste se différencie précocement et prépare le terrain à une organogenèse qui ne débute qu'au bout de 15 jours chez l'homme, contre 10 heures chez le xénope, et 28 heures chez le poussin.

Dans ces conditions, il suffit d'une faible synthèse d'ARN pendant l'ovogenèse, sans structure de chromosomes en écouvillon spécialisée pour un processus de transcription intense. D'autre part, les cycles mitotiques étant lents, il peut y avoir des synthèses d'ARN nouveaux transcrivant le génome de l'embryon, dès le début de la segmentation (transcrits zygotiques détectés à partir des stades 4-8 cellules). D'importantes synthèses d'ARN stables qui gouvernent les premiers stades du développement sont également observées chez de nombreux Invertébrés.

a) Synthèses d'ARN

L'incorporation des précurseurs d'ARN est intense dans les ovocytes en croissance. Une accumulation rapide de transcrits maternels s'effectue pendant la première partie de la croissance ovocytaire (au cours de cette période, 95 % de la totalité des ARN ont été synthétisés, alors que l'ovocyte n'a atteint que 65% de son volume final). On relève, comme chez les Amphibiens, une forte production de pré-messagers dont 19% au lieu de 2 % dans les cellules somatiques, sont à l'origine des ARN-m stables qui s'accumulent dans le cytoplasme sous la forme polyadénylée.

• *Sites de synthèse*

L'accumulation des ARN-r n'est pas aussi importante que chez les Amphibiens. Il n'y a d'amplification des organisateurs nucléolaires que chez les Primates dont l'homme, avec formation de quelques nucléoles surnuméraires. Ailleurs, les nucléoles grossissent considérablement pendant l'ovogenèse (90 fois chez la souris). On a calculé que les synthèses d'ARN-r n'étaient pas plus élevées dans les ovocytes en croissance que dans des cellules en culture. Ils représentent cependant la plus grande partie des ARN synthétisés.

Les chromosomes, pendant le stade diplotène, n'ont pas de véritable structure en écouvillon mais présentent une chromatine déspiralisée. La fréquence de transcription a été calculée sur cette dernière. Un départ toutes les 8 minutes par unité de transcription suffit à assurer le taux de synthèse qu'on connaît chez les Mammifères¹. Un tel rythme fait que les molécules d'ARN transcrits sont très espacées, ce qui explique que la structure en boucles des chromosomes en écouvillon ne puisse s'observer ici.

• *Stabilité des ARN synthétisés*

Après injection à des souris d'un précurseur d'ARN marqué, on mesure au bout de 2 jours la radioactivité des ARN dans l'ovaire. Le taux de radioactivité constaté se retrouve à 80 % dans les ovocytes qui sont pondus 10 à 20 jours plus tard. Toutes les catégories d'ARN sont marquées (Brower et coll., 1981).

Le contenu de l'ovocyte en ARN augmente de 20 fois. Les ARN-m non traduits pendant l'ovogenèse s'accumulent sous forme d'ARN-m faiblement polyadénylés stables. On observe une variabilité d'une espèce à l'autre dans la quantité d'ARN accumulée dans l'ovocyte. Les Primates peuvent avoir 20 fois plus d'ARN que la souris, le lapin 10 fois plus. C'est pourquoi, chez la souris, une reprise rapide des synthèses d'ARN est nécessaire, dès le début de la segmentation.

Une part importante des ARN-m maternels accumulés dans l'ovocyte des Mammifères semble destinée à la synthèse des protéines qui modifient l'environnement de l'utérus maternel : chez la souris, présence d'ARN-m codant pour des protéines sécrétées par les cellules du trophoblaste qui digèrent la matrice extracellulaire de la paroi utérine et permettent l'implantation du blastocyste.

1. L'ovocyte de souris aurait environ 40 000 sites de transcription sur l'ensemble de ses chromosomes dupliqués.

b) Synthèses de protéines

La teneur en protéines augmente de 100 fois pendant la croissance. De nombreuses synthèses protéiques se déroulent pendant l'ovogenèse : 23 % des ARN-m de l'ovocyte sont inclus dans les polyribosomes et sont traduits en protéines, mais le taux de synthèses est faible. On en a détecté près de 400 sortes différentes. Les histones, pour les toutes premières divisions (10 cellules), l'actine, la tubuline, les protéines de la zone pellucide, etc. La nature des protéines synthétisées change pendant la maturation. Il est possible que l'ovocyte en croissance absorbe aussi, par endocytose, des protéines circulant dans le sang maternel (Wassarman, 1983).

3.4 MATURATION DE L'OVOCYTE

Chez les Vertébrés, lorsque l'ovocyte primaire a achevé sa croissance, il passe par une phase de repos dont il sort sous l'action d'hormones. Le début de la maturation s'exprime morphologiquement par la rupture de la vésicule germinative à la suite de la désorganisation de l'enveloppe nucléaire.

3.4.1 Manifestations morphologiques : achèvement de la première division de méiose et arrêt en métaphase de seconde division

Chez les Vertébrés, la 1^{ère} division s'achève avec émission du premier globule polaire au moment de l'ovulation, avant la fécondation, ce qui correspond, pour les Mammifères, à la rupture du follicule de De Graaf. L'ovocyte entouré de la corona radiata se sépare de la granulosa. L'influence inhibitrice exercée par celle-ci sur l'ovocyte grâce aux communications cellulaires au niveau du cumulus oophorus est levée. Ainsi, des transferts d'AMPC par les jonctions communicantes depuis la granulosa vers l'ovocyte cessent. Comme des taux élevés d'AMPC inhibent la maturation de l'ovocyte, la baisse de son taux et, consécutivement celle de l'activité de la protéine kinase A, entraînent la reprise de la première division de méiose. Chez les Amphibiens, le noyau de l'ovocyte est proche de la membrane plasmique au pôle animal. Il est localisé au niveau d'une tache claire qui s'est formée dans la couche pigmentaire corticale au moment de l'émission du premier globule polaire, c'est la tache de maturation. Le fuseau mitotique qui se forme s'oriente perpendiculairement à la membrane plasmique, et pénètre partiellement dans le cortex de l'ovocyte. A la télophase, deux cellules très inégales se forment, le 1er globule polaire et l'ovocyte II, tous deux haploïdes. Très rapidement, les chromosomes de l'ovocyte II s'organisent en métaphase de la seconde division de méiose.

Lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, les protéines du nucléoplasme se dispersent et des va-et-vient de celles-ci entre cytoplasme et noyau s'observent par la suite jusque dans les cellules de la blastula.

De même, des ARN présents dans la vésicule germinative gagnent le cytoplasme et occupent des localisations qui seraient en rapport avec de futurs territoires et avec un plan de symétrie dorso-ventral (Imoh et coll., 1984).

C'est enfin au moment de la maturation que les granules corticaux provenant de l'appareil de Golgi se mettent en place en association étroite avec le cytosquelette sous-membranaire. Les centrioles maternels auraient disparu avant la reprise de la méiose.

Chez les Invertébrés, la maturation est provoquée par d'autres facteurs. Ainsi, pour l'Oursin, c'est la ponte dans l'eau de mer qui entraîne les deux divisions de méiose ; chez les Nématodes, c'est la pénétration du spermatozoïde qui déclenche la méiose.

3.4.2 Mécanisme de la maturation (fig. 3.11)

On a montré le rôle successif de deux catégories de substances : le facteur promoteur de maturation **MPF** (pour « **M**aturation/**M**itosis **P**romoting **F**actor ») et le facteur cytotatique **CSF** (pour « **C**ytostatic **F**actor »). Chez les Amphibiens, le déclenchement de la maturation est sous la dépendance de la progestérone qui intervient indirectement dans la formation et l'activation de ces deux facteurs.

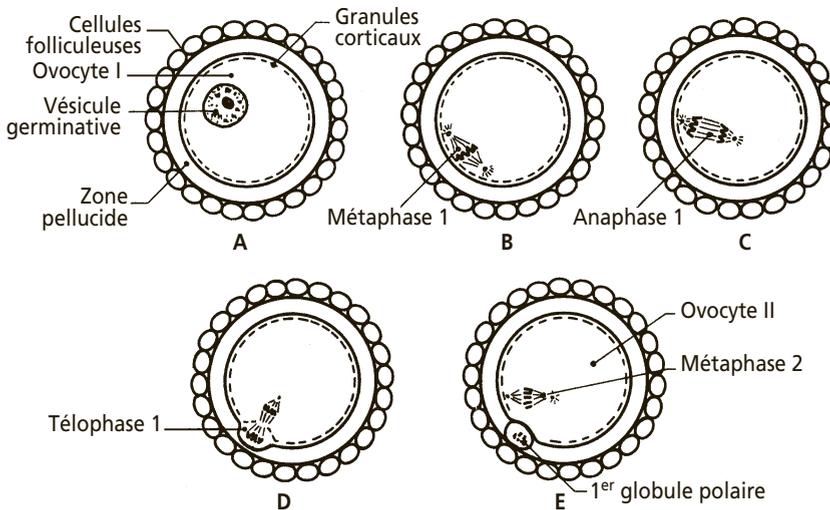


Figure 3.11 - Maturation de l'ovocyte de Mammifère avant l'ovulation.

A à D : déroulement de la première division de méiose, avec rotation du fuseau mitotique à l'anaphase, ce qui permet la formation de deux cellules filles de taille inégale. **E** : ovocyte II et le 1^{er} globule polaire.

a) Le facteur promoteur de maturation (MPF)

Découvert dans les œufs d'Amphibiens, il existe dans toutes les cellules d'eucaryotes et intervient dans le passage G2/M de la mitose ou de la méiose. Il correspond à un complexe protéique associant une cycline, la **cycline B**, synthétisée avant la reprise de la division cellulaire à partir d'un stock d'ARN-m maternels, et une protéine kinase cycline-dépendante, la **protéine p34**, encore désignée sous les termes de **kinase cdc2** ou **cdk1**.



Une cascade de phosphorylation aboutit à l'activation de la protéine p34 rendant le MPF actif. Ces phosphorylations sont déclenchées par l'activité d'une phosphoprotéine de 39kDa, la protéine c-mos encore nommée pp39mos, produit du proto-oncogène *c-mos*. La protéine mos est synthétisée dès le début de la maturation sous l'effet de la progestérone, à partir d'ARN-m inactifs transcrits pendant l'ovogenèse. Le MPF rendu actif est à l'origine de toute une cascade de phosphorylations de protéines cibles permettant ici la reprise de la méiose dans l'ovocyte compétent : phosphorylation notamment de l'histone H1, permettant une condensation chromosomique, et de lamines, entraînant la désorganisation de l'enveloppe nucléaire et la rupture de la vésicule germinative. Le MPF intervient également dans l'organisation du fuseau de division en interagissant avec les MAPs (pour « Microtubule Associated Proteins »).

L'activité du MPF disparaît lors de la transition métaphase-anaphase par suite de la destruction de la cycline B, et la division I de méiose s'achève avec l'émission du 1^{er} globule polaire. Dès la fin de cette division, de nouvelles cyclines sont synthétisées permettant à nouveau la formation d'un MPF actif induisant la seconde division méiotique. Chez les Vertébrés, cette division se bloque en métaphase sous l'action du second facteur évoqué précédemment, le CSF.

b) Le facteur cytotatique (CSF)

Il existe chez tous les Vertébrés. On considère qu'il est constitué par **c-mos** évoquée précédemment et une protéine kinase cycline-dépendante (**cdk2**).

Le CSF a une activité de protéine kinase élevée. Son activité aboutit ici à bloquer la seconde division de méiose en métaphase en empêchant, semble-t-il, la dégradation de la cycline du MPF.

Au moment de la fécondation, le CSF est dégradé par suite d'une libération de Ca^{++} intracellulaire (voir § 4.3.1). La cdk2 est inactivée par une protéine-kinase calmoduline-dépendante (Cam-PKII) rendue active par la calmoduline, elle-même activée par ce flux de Ca^{++} , et c-mos est dégradée par une enzyme protéolytique Ca^{++} -dépendante, la calpaïne II. Le blocage de la métaphase II est levé et la seconde division de méiose peut alors s'achever.

3.4.3 Réactivation des synthèses à la maturation

a) Réactivation des synthèses de protéines

Les synthèses de protéines sont réactivées et augmentent continuellement pendant la maturation, avec un maximum au moment de l'émission du premier globule polaire. Elles se maintiennent à un niveau élevé pendant plusieurs heures. Les synthèses surviennent même dans un ovocyte d'Amphibien énucléé s'il est soumis à l'action de la progestérone. Les ARN-m qui codent pour ces protéines ont donc été synthétisés auparavant. Dans les conditions normales, les protéines néoformées pénètrent dans les noyaux de l'ovocyte. Elles pénètrent également dans des noyaux de cellules somatiques injectés expérimentalement dans des ovocytes mûrs. Parmi ces protéines se trouvent les constituants des facteurs de maturation : le MPF et le CSF.

Des observations analogues ont été faites sur l'ovocyte de souris.

Un mécanisme d'activation de la traduction des ARN-m à la maturation semble être la polyadénylation : addition d'une chaîne poly(A) en 3', de 50 à 300 bases qui précède le début de la traduction en protéines. Des exemples ont été étudiés chez les Amphibiens comme chez les Mammifères : par exemple polyadénylation de l'ARN-m de la protéine *mos* ou de celui de l'activateur du plasminogène, juste avant l'expulsion du 1^{er} globule polaire.

b) Activation et blocage du mécanisme de duplication de l'ADN

La maturation est accompagnée de l'activation d'une ADN polymérase cytoplasmique qui pénètre dans le noyau. On le constate en injectant dans le cytoplasme de l'ovocyte des noyaux provenant de cellules somatiques ; après gonflement dû au passage de protéines cytoplasmiques ovocytaires, ces noyaux incorporent de la thymidine ³H, entrent en division et s'arrêtent en métaphase, sous l'action du CSF.

3.5 L'OVOGENÈSE CHEZ LA DROSOPHILE

Quelques mécanismes généraux qui président au développement d'un organisme commencent à être compris, grâce à des connaissances acquises d'abord sur la drosophile et généralisées ensuite à un bon nombre de Métazoaires. C'est pourquoi des notions sur l'embryogenèse de cet Insecte, qu'on peut considérer commencer avec l'ovogenèse, nous paraissent indispensables.

La drosophile est l'animal dont la génétique est la mieux connue. Toute anomalie dans son organisation a pu être reliée au dysfonctionnement de certains gènes. On a montré qu'un certain nombre de gènes contrôlant la polarité de la larve et de l'adulte sont des gènes maternels exprimés dès l'ovogenèse et dont les protéines qui les traduisent se trouvent dans le cytoplasme de l'ovocyte. L'étude de cette ovogenèse est nécessaire pour comprendre le rôle des composants du cytoplasme de l'ovocyte dans l'organisation d'un animal.

3.5.1 Organisation de l'ovaire et des ovarioles

Les ovaires des Insectes sont composés d'ovarioles qui débouchent dans un oviducte (fig. 3.12). Chaque ovariole est un tubule épithélial qui contient, dans sa partie apicale, ou **germarium**, des ovogonies. Dans l'ovariole, sont alignés des ovocytes dont l'état de développement est d'autant plus avancé qu'on s'approche de l'oviducte. Les ovocytes sont entourés de cellules folliculeuses. Dans certains types d'ovaires, ils sont reliés par des ponts cytoplasmiques à des cellules nourricières qui appartiennent aussi à la lignée germinale. La zone de croissance des ovocytes constitue le **vitellarium**.

Chez les Diptères, par exemple la drosophile, les **ovarioles** sont dits **méroïstiques** car ils comprennent des cellules nourricières, et **polytrophiques** car ces cellules nourricières accompagnent l'ovocyte dans le vitellarium au cours de sa descente le long de l'ovariole. (fig. 3.12B).

Le nombre des cellules nourricières dépend du nombre de mitoses réalisées à partir d'une ovogonie. Chez la drosophile, 4 divisions donnent un clone de 16 cellules reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques, dont une seule se différencie en ovocyte I et les 15 autres en cellules nourricières. 4 d'entre elles sont directement reliées à l'ovocyte par 1 pont cytoplasmique.



Certains ovarioles méroïstiques ont des cellules nourricières qui restent proches du germarium. Ces ovaires sont dits **méroïstiques télotrophiques** ou **acrotrophiques** (cas des Hémiptères et de nombreux Coléoptères).

Les ovarioles sans cellules nourricières, c'est-à-dire pour lesquelles les ovocytes accumuleront des réserves à partir de substances provenant de l'hémolymphe après transit ou non par les cellules folliculeuses, sont appelés **panoïstiques** (cas des Odonates ou des Orthoptères par exemple).

3.5.2 Les synthèses d'ARN

Les ovocytes de drosophile n'ont pas de chromosomes en écouvillon et ne synthétisent pas activement d'ARN. Les noyaux ont doublé leur ADN et restent en prophase de division I de méiose. Les ARN sont transcrits dans les cellules nourricières et transportés dans le cytoplasme de l'ovocyte par les ponts cytoplasmiques.

Les synthèses d'ARN sont montrées en faisant incorporer de l'uridine ^3H dans les ovaires et en observant les sites d'incorporation par histo-autoradiographie. Les ARN marqués se retrouvent dans les cellules nourricières. Quelques heures après l'incorporation, on observe le passage progressif des ARN marqués dans l'ovocyte, au niveau des ponts cytoplasmiques. Ces transferts peuvent se solder par une distribution des ARN suivant des gradients de concentration dans le cytoplasme de l'ovocyte.

L'ovogenèse est de courte durée, 12 jours. Des synthèses actives d'ARN sont facilitées par le fait que les cellules nourricières deviennent polytènes par endopolyploïdie, en multipliant par 500 leur lot diploïde de chromosomes, sans division cellulaire.

Comme chez les Amphibiens, les ARN-m et les ribosomes ne s'associent pas en polyribosomes dans l'ovocyte.

Le temps nécessaire aux synthèses d'ARN est beaucoup plus long chez les espèces à ovaires panoïstiques où seuls des chromosomes en écouvillon de l'ovocyte assurent la transcription. Elle est de 100 jours environ chez le criquet.

3.5.3 La vitellogenèse

En fin de croissance, l'ovocyte accumule des protéines de réserve qui sont en majorité synthétisées hors de l'ovaire, dans le corps gras¹. Cette synthèse et ce transfert dans l'ovocyte, en passant par les cellules folliculeuses, sont sous contrôle hormonal. Le vitellus contient aussi des réserves lipidiques et glycogéniques.

1. Corps gras : tissu de réserve des Insectes, riche en lipides.

3.5.4 L'établissement de la polarité de l'ovocyte et son contrôle par des gènes régulateurs

a) Mise en place des axes céphalo-caudal et dorso-ventral de l'embryon et de l'adulte

Les polarités établies dans l'ovocyte sont à la base des axes de l'embryon et de l'adulte. Ces polarités s'établissent au cours de l'ovogenèse : elles résultent de l'activité de plusieurs gènes qui s'expriment dans l'ovocyte, dans les cellules nourricières ou dans les cellules folliculeuses.

Les études des mutants ont permis d'identifier de nombreux transcrits et de préciser leur rôle. Chaque mutation a donné son nom au gène, à l'ARN-m et à la protéine régulatrice correspondants.

Parmi les ARN-m maternels transportés des cellules nourricières vers l'ovocyte et qui sont essentiels dans l'établissement des polarités, nous retiendrons les transcrits *bicoïd* localisés antérieurement, *nanos* dans la région postérieure ainsi qu'*hunchback* et *caudal* uniformément répartis dans le cytoplasme de l'ovocyte mais dont la traduction sera modulée en relation avec les polarités au cours du développement (voir § 11.2.1). La protéine Dorsal, facteur régulateur de ventralisation est la traduction, après la fécondation, de l'ARN-m *dorsal* provenant des cellules nourricières. Elle se trouve répartie dans la totalité du cytoplasme et s'y maintient dans un premier temps par sa combinaison avec Cactus (voir fig. 3.13 et encart 3.4).

Beaucoup de ces ARN-m codent pour des facteurs de transcription. Ces protéines sont traduites dès la fécondation et pénètrent dans le noyau du zygote, puis dans les noyaux de division. Certaines d'entre elles peuvent se lier à l'ADN par une séquence très conservée au cours de l'évolution, l'**homéodomaine**, au voisinage des gènes qu'elles contrôlent en les activant ou en les inhibant. On retrouve ces caractéristiques dans d'autres protéines qui seront étudiées plus loin (voir chap. 11).

b) Le gène *bicoïd*¹ et l'établissement du pôle céphalique (fig. 3.12C et fig. 11.2)

Des larves d'animaux atteints d'une mutation appelée *bicoïd*, létale à l'état homozygote, ne développent ni tête ni thorax, mais deux abdomens affrontés. Partant de cette mutation, le gène déficient a été identifié et appelé gène *bicoïd* (Nüsslein-Volhard² et coll., 1988-1989). Chez les formes sauvages, le gène est transcrit dans les cellules nourricières et l'ARN-m *bicoïd* migre dans l'ovocyte où il se localise au pôle céphalique. Cet ARN-m est traduit, juste après la fécondation, en protéine Bicoïd qui se répartit selon un gradient décroissant antéro-postérieur sur les deux tiers du cytoplasme. Injecté au pôle antérieur d'un ovocyte de mutant *bicoïd*, ce transcrit restaure la capacité de différencier les structures de la tête et du thorax. A l'inverse, la ponction de cytoplasme dans la région céphalique de l'ovocyte normal

1. Il n'existe pas de tréma sur le i dans la terminologie anglo-saxonne.

2. Un prix Nobel a été attribué en 1995 à cet auteur et à son collègue E. Wieschaus pour leurs travaux sur l'ensemble des gènes de polarité de la drosophile.

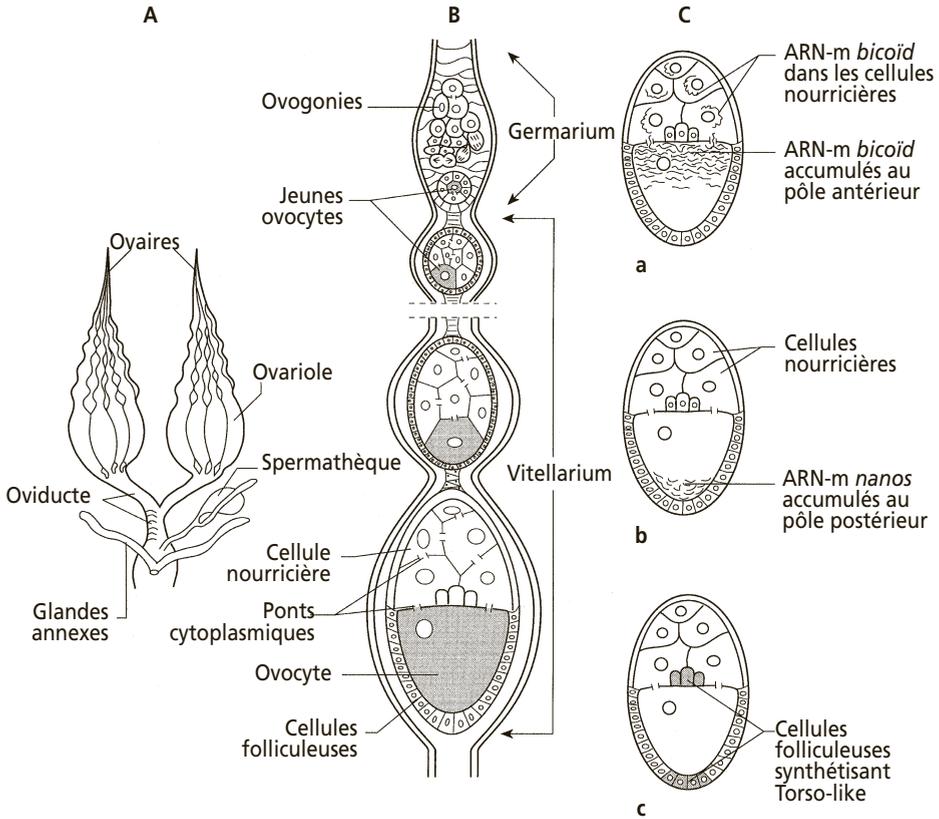


Figure 3.12 - Ovaire d'Insecte.

A : Représentation générale de l'appareil génital femelle. **B :** Ovariole de type méroïstique polytrophique (Ex. : drosophile). Noter l'existence des ponts cytoplasmiques entre les cellules nourricières et l'ovocyte. **C :** Ovocyte proche de la ponte : a : accumulation des ARN-m *bicoid* issus des cellules nourricières au pôle antérieur de l'ovocyte. b : accumulation des ARN-m *nanos* au pôle postérieur, c : cellules folliculeuses synthétisant la protéine Torso-like.

réduit les formations de tête et de thorax. La protéine Bicoïd est responsable de l'inhibition de la traduction de l'ARN-m *caudal* et active dans le noyau zygotique la transcription du gène *hunchback* (tableau 11.1).

c) Le gène *nanos* et l'établissement du pôle postérieur (fig. 3.12 et fig. 11.3)

La polarité postérieure s'établit de façon plus complexe. On connaît en effet 7 gènes à effet maternel, c'est-à-dire transcrits dès l'ovocyte, dont la défction peut être responsable de l'absence d'abdomen.

Le centre organisateur du développement de l'abdomen est localisé dans le cytoplasme postérieur de l'ovocyte : si du cytoplasme de cette région est prélevé dans un ovocyte normal et injecté dans la région postérieure d'un embryon défctueux, il peut rétablir un développement normal.

L'ARN-m *nanos* synthétisé dans les cellules nourricières est finalement transporté au pôle postérieur de l'ovocyte. Il est traduit juste après la fécondation en protéine Nanos, régulatrice d'un développement normal, qui se répartit suivant un gradient décroissant du pôle postérieur vers la région antérieure de l'ovocyte. La protéine Nanos, à la différence de Bicoïd, n'est pas un facteur de transcription et joue un rôle de répresseur pour la traduction des ARN-m *hunchback*. Son rôle dans l'organisation de l'embryon sera examiné dans le chapitre 11.

La double expression régionalisée des gènes à effet maternel, *bicoïd* et *nanos*, entraîne la distribution de Hunchback selon un gradient antéro-postérieur. Concentré dans la région antérieure, ce facteur de transcription y réprime les gènes spécifiques de la région abdominale.

d) Rôle du cytosquelette de l'ovocyte

Il conditionne la migration et la localisation des ARN-m *bicoïd* en position céphalique et *nanos* en position caudale.

Les ARN-m *bicoïd* sont redistribués dans la région antérieure de l'ovocyte par suite de leur liaison par leur région 3'-UTR avec la dynéine, moteur moléculaire se déplaçant vers les extrémités (-) des microtubules localisées du côté antérieur de l'ovocyte. Les transcrits *nanos* sont quant à eux concentrés dans la région postérieure par suite de leur liaison avec la protéine Oskar dont la localisation dans cette région est due au fait que les ARN-m *oskar*, en étant liés à la kinésine I qui se déplace vers les extrémités (+) des microtubules, se retrouvent concentrés dans la région postérieure.



Le réarrangement du cytosquelette conduisant à ce que les extrémités (-) et (+) des microtubules soient respectivement orientées vers les pôles antérieur et postérieur de l'ovocyte est le résultat d'un échange complexe de messages entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses. Au début de l'ovogenèse, le noyau de l'ovocyte est en position postérieure, proche de la membrane plasmique. Des transcrits du gène *gurken* puis son produit sont concentrés entre le noyau et la membrane. La protéine Gurken, analogue à un facteur de croissance, est sécrétée localement vers les cellules folliculeuses les plus proches. Celles-ci ayant des récepteurs à cette protéine codés par le gène *torpedo* sont activées et induisent en retour, par une série d'étapes qu'on n'examinera pas ici, la réorganisation du cytosquelette de l'ovocyte. Cette réorganisation permet, outre la redistribution des transcrits *bicoïd* et *nanos*, la migration du noyau de l'ovocyte vers une position antéro-dorsale (fig. 3.13A, B). Quand le noyau a gagné cette position, de nouveau des transcrits et produits du gène *gurken* s'accumulent entre noyau et membrane plasmique. La protéine Gurken, sécrétée par l'ovocyte, se lie aux récepteurs des cellules folliculeuses proches, ce qui provoque une différenciation dorsale de ces dernières.

e) Polarité dorso-ventrale et centres organisateurs terminaux

Ils résultent des relations entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses pendant l'ovogenèse (fig. 3.13).

Certains gènes de l'ovocyte codent pour des signaux qui sont émis vers les cellules folliculeuses. Le noyau de l'ovocyte est excentré et est proche de la future paroi membranaire dorsale. Les signaux émis sont peu diffusibles, et atteignent d'abord les

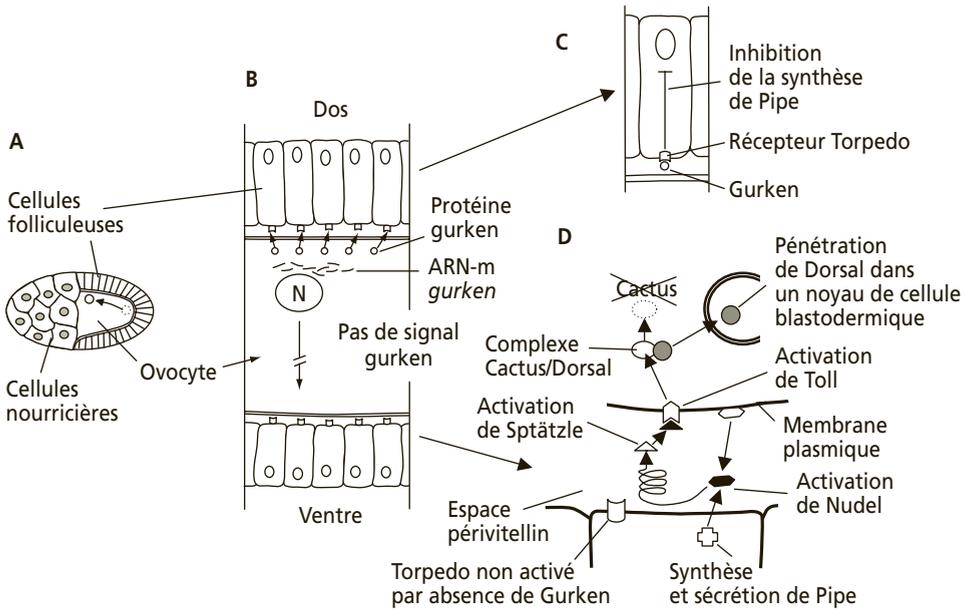


Figure 3.13 - Acquisition de la polarité dorso-ventrale chez la drosophile.

A : Migration du noyau de l'ovocyte du pôle postérieur vers la future région antéro-dorsale.

B : La protéine Gurken est synthétisée dans la région dorsale, où les ARN-m se sont accumulés; elle est sécrétée vers les cellules folliculeuses dorsales, elle ne parvient pas aux cellules folliculeuses ventrales, plus éloignées. N : noyau.

C : Lorsque le récepteur membranaire Torpedo des cellules folliculeuses est activé par Gurken, il s'élabore un signal d'inhibition de la synthèse des protéines ventralisantes telle Pipe.

D : Les cellules folliculeuses ventrales n'ayant pas reçu le signal Gurken, synthétisent la protéine Pipe. Cette protéine participe à l'activation de Nudel, ce qui déclenche une cascade de réactions enzymatiques activant au final une protéine Spätzle. Celle-ci se lie à un récepteur Toll exprimé à la surface membranaire des cellules du blastoderme. L'activation de Toll provoque une suite de réactions aboutissant à la dissociation du complexe Dorsal/Cactus et à la dégradation de la protéine Cactus. La protéine régulatrice Dorsal pourra alors pénétrer dans les noyaux des cellules ventrales du blastoderme et y induire des programmes de différenciation ventrale : mésoderme, etc.

cellules folliculeuses jouxtant cette paroi. Ces signaux sont constitués par diverses protéines dont le produit du gène *gurken*. Ce dernier en se liant au récepteur Torpedo des cellules folliculeuses y entraîne l'inhibition de la synthèse de la protéine Pipe. En revanche, ce signal n'atteint pas les cellules folliculeuses qui sont éloignées du noyau de l'ovocyte et qui peuvent ainsi synthétiser cette protéine. Il en résulte des différences entre l'activité des cellules folliculeuses dorsales et ventrales qui sécréteront donc, vers l'ovocyte, des protéines distinctes (voir encart 3.4).

Il existe aussi deux autres centres organisateurs dans les cellules folliculeuses des extrémités du follicule ovarien (fig. 3.12C) qui dirigent l'organisation de l'acron et du telson de la drosophile, régions de l'embryon se situant respectivement en avant

et en arrière de la zone métamérisée (fig. 7.2H). La mutation d'un même gène clé, le gène maternel *torso* codant pour un récepteur membranaire, empêche la différenciation de ces deux extrémités.

Dans les conditions normales, l'ARN-m *torso* est traduit après la fécondation en une protéine Torso présente dans toute la membrane ovocytaire, sous forme inactive. Elle n'est activée que par une protéine synthétisée et sécrétée par les cellules folliculeuses situées aux extrémités apicales du follicule, la protéine Torso-like. La protéine Torso est un récepteur membranaire tyrosine-kinase dont l'activation aux extrémités de l'ovocyte déclenche l'inactivation de Groucho, protéine réprimant l'expression des gènes de différenciation des régions terminales dans l'œuf. La différenciation de l'acron dépend de l'activation de Torso et de la présence de Bicoïd, celle du telson dépend de la seule activation de Torso.



ENCART 3.4 Interactions moléculaires déterminant la ventralisation

Dans les cellules folliculeuses de la région ventrale qui n'ont pas reçu le signal Gurken, la synthèse de la protéine Pipe est rendue possible. Au stade du blastoderme cellularisé (voir § 7.1), les cellules embryonnaires ventrales expriment *nudel* dont le produit sera activé selon un mécanisme encore incertain par la protéine Pipe sécrétée par les cellules folliculeuses voisines. Nudel activé initie l'activation en cascade de trois sérine protéases sécrétées par l'embryon dans l'espace périvitellin. Cette série de réactions enzymatiques étroitement localisée dans la région ventrale aboutit au clivage d'une protéine Spätzle qui se lie à un récepteur Toll exprimé au niveau des membranes plasmiques des cellules embryonnaires. L'activation de Toll entraîne celle des protéines Pelle et Tube. Cette dernière, en phosphorylant Cactus, provoque sa dégradation et par là-même la libération de la protéine Dorsal avec laquelle Cactus formait un complexe.

Cette protéine Dorsal, produit d'ARN-m ayant pour origine les cellules nourricières, passe dans les noyaux des cellules ventrales du blastoderme (voir § 11.2.2) et se distribue selon un gradient de localisations nucléaires décroissant ventro-dorsalement.

3.6 RÉSULTAT DE L'OVOGENÈSE : COMPLEXITÉ DE LA CELLULE ŒUF

L'œuf vierge ne peut être considéré comme une cellule indifférenciée banale. Il a emmagasiné, avec une organisation spatiale précise, des ARN stables et certaines protéines qui conditionneront le début du développement embryonnaire (voir 3^e partie). Cette règle est particulièrement bien illustrée chez la drosophile (voir les données précédentes) ; elle semble universelle, comme le montrent de nombreux travaux portant sur des espèces appartenant à des taxons autres que celui des Insectes.

3.6.1 Structure de l'œuf

Une description de la structure des œufs d'Amphibien, d'Oiseau et de Mammifère est donnée dans la 2^e partie (chap. 8 à 10) relative à l'Embryologie descriptive.

De façon générale, l'œuf est une cellule polarisée. Chez les Amphibiens, cette polarité s'acquiert très tôt ; la polarité animale-végétative s'établit dans les ovogonies du xénope lorsque se constitue le nuage mitochondrial, ou corps de Balbiani, élément du plasma germinatif (voir § 17.1.2a). Des ARN-m stables y sont déjà présents, comme ceux qui codent pour le facteur de transcription VegT (voir § 12.5.5). Ce nuage se localise d'abord au voisinage du noyau, et l'axe qui passe par le noyau et ce nuage constitue l'axe animal-végétatif. Plus tard, la répartition des plaquettes vitellines obéit à cette polarité, avec un gradient de répartition croissant suivant un axe pôle animal – pôle végétatif. Il en résulte une position du noyau plus ou moins excentrée vers le pôle animal où il est entouré d'un cytoplasme plus pauvre en réserves vitellines, mais plus riche en ribonucléoprotéines.

Sous la membrane plasmique se trouve une fine couche de cytoplasme visqueux, le **cortex**, riche en éléments cytosquelettiques, en particulier en microfilaments d'actine, et dépourvu de réserves vitellines. Chez de nombreuses espèces (certains Mollusques, Échinodermes, Amphibiens Anoures, quelques Mammifères, etc.) il existe dans le cortex des vésicules de 1 à 2 µm de diamètre, les **granules corticaux**. Provenant de l'appareil de Golgi, ces vésicules contiennent des enzymes protéolytiques, diverses glycoprotéines, des mucopolysaccharides (fig. 4.5). Lors de la fécondation, leur contenu est déversé dans l'espace périovocytaire, ce qui jouera un rôle important dans la protection contre la polyspermie (voir § 4.3.2).

Lors de la ponte ovulaire, l'ovule est une cellule qui est pourvue de protections particulières désignées sous les termes de **membranes** ou **enveloppes primaires**. Celles-ci, constituées dans l'environnement ovarien, correspondent, selon les espèces, à la membrane vitelline ou à la zone pellucide. Chez les espèces ovipares, durant son transit dans les voies génitales femelles précédant sa ponte dans le milieu extérieur, l'œuf fécondé ou non s'entoure de dépôts qui formeront les **enveloppes secondaires** (albumine, membrane coquillière et coquille chez les Sauropsidés, gangue muqueuse chez les Échinodermes et les Amphibiens). Quoique d'une origine différente, on assimile la corona radiata des Mammifères à une enveloppe secondaire.

3.6.2 Existence des localisations cytoplasmiques particulières dans l'œuf

De façon générale, dans de nombreuses espèces d'Invertébrés, notamment celles regroupées dans l'ensemble des Spiralia (Annélides, certains Mollusques...), les Nématodes ou encore certains Urocordés telles les Ascidies, la destinée des cellules au cours de la segmentation est très précise (voir § 12.2.2). Cette rigueur peut s'expliquer par des distributions différentielles dans le cytoplasme ovulaire, de molécules (ARN-m, protéines...) désignées sous le terme de **déterminants cytoplasmiques** (voir § 3.3.1f et 12.2.1) qui, localisées dans quelques blastomères lors de la segmentation, confèrent à ceux-ci des caractéristiques et un devenir spécifiques. L'importance des localisations cytoplasmiques en relation avec les activités nucléaires est étudiée au chapitre 12. Il semble que l'édifice moléculaire constitué par ces localisations est d'autant plus rigoureux que l'œuf fécondé aura à se déve-

lopper très vite en une larve pouvant mener une vie autonome. Les Mammifères, protégés pendant toute l'embryogenèse, ne montrent pas dans leurs ovocytes de caractères d'organisation aussi stricts.

Parmi les divers déterminants cytoplasmiques ovocytaires, on peut mentionner ceux qui, en se retrouvant seulement dans quelques blastomères, amènent ces derniers à être à l'origine des cellules germinales primordiales (voir § 17.1.2). La mise en place de la lignée germinale, par suite d'une localisation précoce de déterminants cytoplasmiques spécifiques dans certaines cellules, a été particulièrement bien étudiée chez certaines espèces d'Amphibiens Anoures (plasme germinatif), d'Insectes (plasme polaire chez la drosophile) et de Nématodes (granules P chez *Caenorhabditis elegans*).

3.6.3 Effets maternels sur le développement

Les effets maternels sur le développement sont une conséquence de cette organisation de l'œuf avant la fécondation : le début du développement dépend toujours, pour une période plus ou moins longue, de la traduction de gènes maternels. Un caractère mutant apporté par la mère pourra ne pas être compensé par le gène paternel. C'est le cas de plusieurs mutations comme *bicoïd* de la Drosophile, par exemple (voir § 3.5.4b).

La traduction en protéines des ARN transcrits par les gènes maternels est étudiée pendant la segmentation (voir chap. 12). L'importance, pour la suite du développement, du matériel déposé dans le cytoplasme ovocyttaire et synthétisé par la mère seule a été mise en évidence chez la drosophile (voir § 3.5.4). Nous compléterons par un autre exemple : la dominance du caractère maternel dans l'enroulement d'une coquille de Gastéropode.



Chez les Gastéropodes, la direction d'enroulement des spires de la coquille est soit dextrogyre (enroulement vers la droite), soit senestrogyre (enroulement vers la gauche). Ce caractère est contrôlé par une seule paire de gènes; le gène dextre « D » est dominant sur son allèle senestre « d ». Pour un individu donné, le sens de l'enroulement est déterminé par le génotype de la mère et non de l'embryon. Les mères « D x D », « D x d », auront une descendance entièrement dextre, les mères « d x d » auront une descendance senestre, quel que soit l'allèle apporté par les spermatozoïdes qui fécondent ces œufs. Les facteurs déterminant le sens de l'enroulement se trouvent en effet dans le cytoplasme de l'ovocyte avant la fécondation et sont l'expression du génotype de l'ovaire dans lequel l'ovocyte se développe. Ce n'est qu'à la génération suivante que l'influence paternelle pourra être éventuellement observée selon la nature de l'allèle apporté par le spermatozoïde. En effet, cet allèle est un élément du génome du nouvel individu et participe aux synthèses des ovogénèses d'où sortiront les œufs de la génération suivante.

On peut d'ailleurs modifier le sens de l'enroulement d'embryons : si du cytoplasme ovocyttaire, provenant d'ovocytes de femelle «D x d» ou «D x D» est injecté dans les ovocytes de femelle «d x d», le sens de l'enroulement des embryons sera dextrogyre.

Résumé

L'ovogenèse, ou production de gamètes femelles, présente des caractéristiques communes à toutes les espèces. Les ovules sont plus volumineux que les spermatozoïdes, avec un cytoplasme contenant des molécules informatrices et des réserves. Cet ensemble ne se divise pas durant la méiose mais se retrouve intact par le jeu d'une répartition inégale du cytoplasme entre ovocyte II et premier globule polaire puis entre l'ovotide et le second globule polaire. Les informations accumulées sous la forme d'ARN à durée de vie longue présentent une stabilité qu'on ne retrouve pas dans les cellules somatiques.

La production d'ovules par une espèce est d'autant plus élevée que les probabilités pour chaque ovule d'être fécondé et, pour chaque œuf, de se développer jusqu'à son terme sont faibles. C'est le cas des espèces parasites ou des espèces à fécondation externe qui sont, pour la majorité, aquatiques. À l'inverse, chez les espèces à fécondation interne (Mammifères, Insectes...) et plus encore chez les espèces où l'embryon se développe dans l'organisme maternel (Mammifères vivipares) ou dans un œuf à réserves abondantes incubé dans un milieu protégé (Oiseaux), les chances d'un développement complet sont élevées, la production en gamètes femelles est beaucoup plus faible.

L'ovogenèse peut être considérée comme la première étape du développement embryonnaire dans la mesure où, dans le cytoplasme ovocytaire, l'accumulation et la distribution d'informations sous forme d'ARN stables et de diverses protéines régulatrices conditionnent le plan d'organisation et le déroulement du développement de l'embryon telles que Dishevelled, VegT, Vgl, etc. L'hétérogénéité du cytoplasme ovocytaire est un élément clef pour que s'amorce plus tard une rapide diversification cellulaire. L'accumulation en plus ou moins grandes quantités de réserves vitellines permet une plus ou moins grande autonomie de développement.

Les ovocytes ne se développent qu'en association étroite avec des cellules somatiques qui les entourent et forment avec celles-ci des follicules. Chez les Vertébrés, ces ensembles possèdent une activité endocrine.

Le gamète femelle pondu par l'ovaire et prêt à être fécondé peut, selon les taxons, être un ovocyte I (Annélides, Insectes), un ovocyte II bloqué en métaphase de division II de méiose (Vertébrés) ou un ovotide (Echinodermes). On lui donne l'appellation générale d'ovule, cette définition ne prenant pas en compte le stade de l'ovogenèse dans lequel se trouve cette cellule.

Questions

- 3.1 Qu'est-ce qu'un ovule ?
- 3.2 Dans quels taxons de Vertébrés peut-on observer des ovaires de type creux ?
- 3.3 A quel stade de l'ovogenèse le gamète femelle se trouve-il chez les Vertébrés ?
- 3.4 Dans l'espèce humaine, à quelle période la multiplication ovogoniale s'effectue-t-elle ?
- 3.5 Définissez le phénomène d'atrésie
- 3.6 À quoi la vitellogenèse correspond-elle et l'observe-t-on chez toutes les espèces ?
- 3.7 A quelle origine hormonale peut-on rattacher la maturation des follicules ?
- 3.8 Quelle est l'origine du corps jaune et quelle est sa fonction ?
- 3.9 À quoi la décharge ovulante correspond-elle ?
- 3.10 Quels sont les types de substances produits par les cellules folliculeuses ?
- 3.11 À quoi l'amplification nucléolaire observée chez les Amphibiens correspond-elle ?

Réponses page 381

- 4.1 Rencontre de l'ovule et des spermatozoïdes
- 4.2 Reconnaissance et adhérence des gamètes
- 4.3 Réactions membranaires de l'œuf
- 4.4 Rétablissement de la diploïdie par fusion des pronuclei
- 4.5 Conséquences de la fécondation du point de vue structural et métabolique
- 4.6 La parthénogenèse

La fécondation est le résultat de la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule suivie de la fusion des noyaux de ces deux gamètes ou **amphimixie**. Il se forme ainsi un œuf fécondé ou **zygote**. Outre les processus conduisant successivement à la rencontre, l'adhérence spécifique puis la fusion des gamètes, deux autres aspects peuvent être distingués lors de la fécondation, l'activation de l'ovule et le rétablissement de la ploïdie caractéristique de l'espèce.

L'activation du gamète femelle le fait ou bien sortir d'une inertie physiologique où il était entré après la maturation, comme c'est le cas chez les Oursins, ou bien amplifier les synthèses qui avaient débuté à la maturation, comme chez les Amphibiens.

L'amphimixie confère à la fécondation sa dimension génétique par le rétablissement de la diploïdie. En effet, dans les conditions normales, quelle que soit la nature de l'ovule, la fusion ne se fait qu'entre **pronuclei** mâle et femelle haploïdes, c'est-à-dire seulement après l'achèvement de la méiose pour le gamète femelle. C'est lors de ce processus que la détermination génétique du sexe est établie.

La majorité des travaux qui ont permis de comprendre la fécondation chez les animaux ont porté sur les Oursins ou les Amphibiens dont on peut se procurer les produits génitaux en abondance. Nous choisirons la plupart de nos exemples dans ces groupes et apporterons également les précisions propres aux Mammifères.

4.1 RENCONTRE DE L'OVULE ET DES SPERMATOZOÏDES

Chez la plupart des animaux aquatiques, il n'existe pas de fécondation interne. Si des rapprochements et des accouplements se produisent entre mâle et femelle chez certaines espèces, par exemple chez des Amphibiens, ceux-ci sont rares voire inexistantes dans la majorité des cas. Malgré la nature du milieu créant un facteur de dilution néfaste à la fécondation, les rencontres entre gamètes sont néanmoins favorisées par différents moyens. Outre la production d'un grand nombre de gamètes, on constate une synchronisation de l'activité gamétogénétique entre les deux sexes dépendant de

facteurs environnementaux (saisons, cycles lunaires, etc.) et se soldant par l'émission simultanée des produits génitaux. Généralement, les pontes déclenchent aussitôt chez les mâles, l'émission de spermatozoïdes, comme chez les Annélides Polychètes. Ces facteurs déterminent aussi parfois des comportements de rassemblement des deux sexes en des milieux restreints, ce qui accroît les probabilités de rencontre des gamètes. Chez les animaux terrestres (dont les Mammifères), la fécondation est interne et la maturation des ovules est contemporaine ou proche de l'insémination des spermatozoïdes. Cette simultanéité dans l'émission des gamètes est d'autant plus importante que la durée de vie des cellules sexuelles émises est courte : chez l'Oursin, quelques minutes pour les spermatozoïdes en concentration diluée, quelques heures pour les ovules; chez l'homme les spermatozoïdes restent fertiles 2 jours, les ovules 24 heures.

4.1.1 Mécanismes de rencontre chez l'oursin, un animal à fécondation externe

Lillie (1919) a montré que les spermatozoïdes d'oursin en suspension dans l'eau de mer s'agglutinaient à la périphérie des œufs mûrs entourés de leur gangue et que cette attraction ne fonctionnait qu'entre gamètes de la même espèce (phénomène appelé alors réaction fertilisine-antifertilisine). Plus récemment, il a été montré que les spermatozoïdes acquièrent d'abord leur mobilité au sortir de la gonade à la suite d'une modification de leur pH au contact de l'eau de mer, qui passe de 7,2 environ à 7,6, ce qui active l'ATPase de la dynéine (voir § 2.4.2a) ; l'orientation chimiotactique des mouvements des spermatozoïdes est ensuite déterminée par un oligopeptide de 14 acides aminés, le **resact** (Ward et coll., 1985) qui a été identifié dans la gangue ovulaire de l'œuf mûr de l'oursin *Arbacia punctulata*. Il diffuse dans l'eau de mer. Les spermatozoïdes en sa présence changent leurs déplacements désordonnés contre un déplacement rectiligne suivant son gradient de concentration croissante, resact qu'ils reconnaissent spécifiquement grâce à des récepteurs membranaires, de telle sorte qu'ils rencontrent l'œuf. Ces récepteurs ont une activité guanylate-cyclase. Liés au resact, ils sont activés et le cGMP formé ouvre les canaux Ca^{++} . Le Ca^{++} active la motilité du spermatozoïde en activant également les ATPases mitochondriales et la dynéine. La fonction du resact est donc double.

Ce type d'attraction par chimiotaxie a été décrit pour de nombreuses espèces d'Invertébrés aquatiques à fécondation externe. En particulier, chez les Oursins, plus de 70 peptides agissant comme des médiateurs chimiques stimulant l'activité des spermatozoïdes ont été isolés à partir de différentes espèces.

4.1.2 Mécanismes de rencontre chez un Mammifère, un animal à fécondation interne

Différents facteurs interviennent. L'activité des spermatozoïdes est stimulée par le contenu du liquide séminal (à pH alcalin). Le milieu à pH acide des voies génitales femelles (vagin) est défavorable à leur survie. C'est juste avant l'ovulation que les spermatozoïdes franchissent le col de l'utérus, dans les conditions les plus favorables : le pH est alors alcalin. On a aussi montré récemment que les spermatozoïdes sont sensibles à un gradient de température dans les voies génitales femelles. La

texture du mucus sécrété par le col de l'utérus (**glai­re cervicale**) acquiert une configuration plus favorable au passage des spermatozoïdes pendant la courte période où l'ovule est fécondable. Sur quelques centaines de millions de spermatozoïdes émis, quelques millions seulement franchissent cette barrière. Leur progression vers les trompes utérines se fait par leurs mouvements flagellaires propres, combinés aux mouvements ciliaires et aux contractions de la paroi de l'utérus. Quelques centaines arrivent jusqu'à l'ovocyte. Les cellules de la **corona radiata** enrobées de glycoprotéines forment des expansions autour de l'ovocyte qui captent les spermatozoïdes et, par rétraction, les amènent à proximité de la zone pellucide.

Les ovocytes et les cellules du cumulus oophorus sécrètent des molécules qui attirent les spermatozoïdes. Si ces sécrétions sont prélevées (à partir d'ovocytes destinés à des fécondations *in vitro*) et microinjectées dans une suspension de spermatozoïdes humains ayant subi la capacitation (voir § 2.4.2c), elles provoquent des mouvements orientés de ceux-ci. Ne sont efficaces que les sécrétions provenant des follicules contenant des œufs fécondables (Sun et coll., 2005).

4.2 RECONNAISSANCE ET ADHÉRENCE DES GAMÈTES

Le spermatozoïde arrive au contact de la membrane plasmique ovulaire grâce à la libération des enzymes hydrolytiques qui s'effectue lors de la réaction acrosomique, ce qui lui permet de digérer et de traverser les enveloppes entourant l'ovule. De profondes analogies ont été observées dans les diverses étapes de la fécondation décrites chez plusieurs espèces de Vertébrés et d'Invertébrés. On se limitera aux cas des Oursins et des Mammifères.

4.2.1 Adhérence des gamètes chez un Invertébré : l'oursin (fig. 4.1)

La réaction acrosomique se produit en présence de la gangue d'un œuf de la même espèce. La partie apicale de la membrane plasmique du spermatozoïde fusionne avec la membrane externe de la vésicule acrosomique et l'acrosome s'ouvre ; cette réaction est consécutive à un influx de Ca^{++} . Dans le même temps, un échange d'ions avec le milieu extérieur, un influx de Na^+ compensant un efflux de H^+ , provoque une élévation du pH intracellulaire.

La tête spermatique de l'oursin possède, entre l'acrosome et le noyau, du matériel post-acrosomique constitué par de l'actine sous forme globulaire. Celle-ci se polymérise alors, ce qui entraîne la formation d'un tubule acrosomique dont l'axe est constitué par des microfilaments d'actine.

Les enzymes contenues dans l'acrosome sont libérées et permettent au tubule acrosomique de traverser par digestion la gangue gélatineuse et d'atteindre la membrane vitelline.

Lors du contact entre le tubule acrosomique et la membrane fibreuse vitelline se produit un phénomène de reconnaissance et d'adhérence spécifiques : au cours de l'extrusion, la membrane acrosomique expose sur sa face interne des molécules d'une protéine de 30,5 kDa, la **bindine** qui est caractéristique de l'espèce et qui est reconnue par des récepteurs glycoprotéiques de 350 kDa (EBR1) portés par la

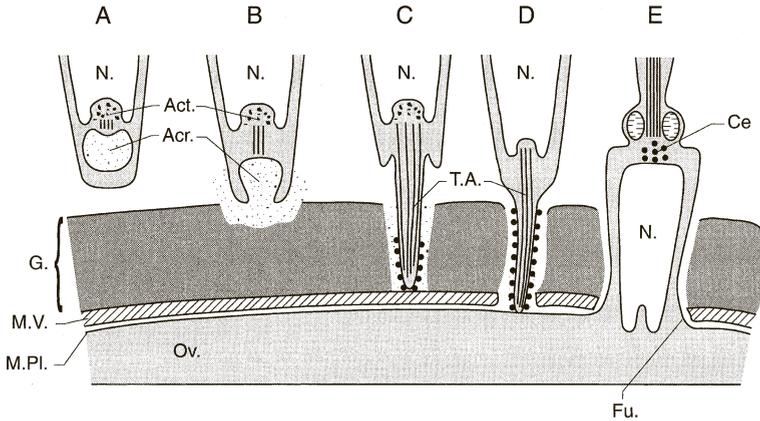


Figure 4.1 – Schéma récapitulatif des étapes de la pénétration du spermatozoïde pendant la fécondation chez l'oursin.

A : Région acrosomique du spermatozoïde. **B** : L'acrosome s'ouvre au contact de la gangue. **C** et **D** : L'actine du matériel post-acrosomique se polymérise et le tubule acrosomique se développe. **C** : Les enzymes de l'acrosome digèrent la gangue; des molécules de bindine portées par la membrane acrosomique interne se lient à des récepteurs de la membrane vitelline. **D** : La membrane vitelline est à son tour digérée; le tubule acrosomique entre en contact avec la membrane plasmique de l'ovule. **E** : Les membranes du spermatozoïde et de l'ovule ont fusionné (Fu). Un cône de fécondation est en cours de formation. Acr : acrosome, Act : actine. Ce : centriole, G : gangue, N : noyau, M V : membrane vitelline, M PI : membrane plasmique, Ov : ovule, T.A. : tubule acrosomique.

membrane vitelline. Ceux-ci sont regroupés en complexes de quelques centaines de molécules, concentration nécessaire pour lier le spermatozoïde à l'ovocyte. La liaison qui s'établit assure l'adhérence entre les deux gamètes, mâle et femelle.

4.2.2 Adhérence des gamètes chez les Mammifères (fig. 4.2)

La pénétration des spermatozoïdes à travers la barrière cellulaire de la corona radiata est facilitée par la dissociation partielle du ciment intercellulaire sous l'action d'enzymes sécrétées par les parois de l'ampoule de l'oviducte. La capacitation des spermatozoïdes est un préalable indispensable aux processus de reconnaissance et de fixation comme il a été montré au chap. 2. À la différence de ce qui a été décrit chez l'oursin, les spermatozoïdes parviennent à la zone pellucide, qui joue un rôle analogue à celui de l'enveloppe vitelline des Invertébrés, sans avoir subi la réaction acrosomique. Celle-ci se produira, suite à la fixation.

a) Adhérence du spermatozoïde à la zone pellucide

Chez les Mammifères, la fixation à la zone pellucide se réalise en deux étapes entre lesquelles se produit la réaction acrosomique.

Chez la souris, une liaison faible s'établit d'abord entre une protéine membranaire spermatique de 250kDa et une protéine sécrétée par la paroi de l'oviducte et enrobant la zone pellucide (Rohefer et Shur, 2004). Une seconde protéine de la

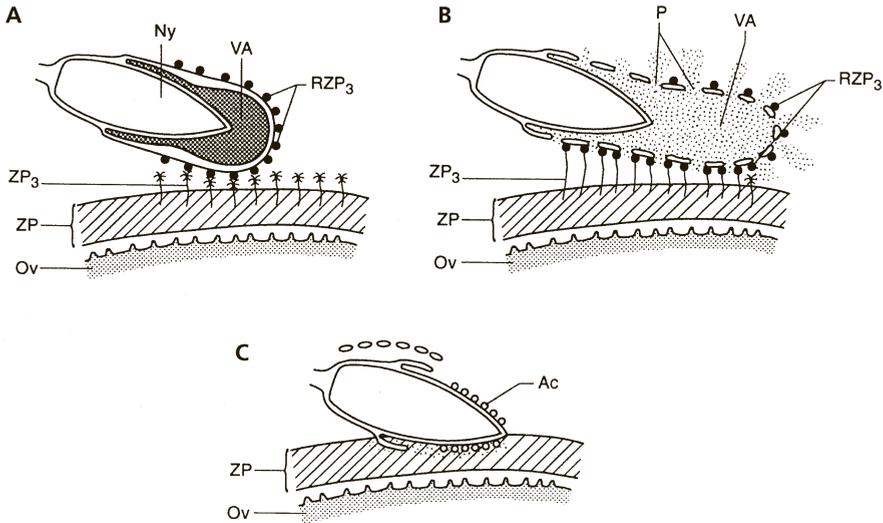


Figure 4.2 - Réaction acrosomique au cours de la fécondation chez un Mammifère.

A : Le spermatozoïde entre en contact avec la zone pellucide et se lie à la protéine ZP3 par divers récepteurs R ZP3. **B :** Les récepteurs spermatiques s'agrègent; la membrane externe de l'acrosome et la membrane plasmique fusionnent et des pores se forment d'où s'échappent les enzymes de l'acrosome. **C :** La tête spermatique pénètre dans la zone pellucide, digérée localement par l'acrosine fixée sur la paroi interne de l'acrosome. Ac. : acrosine, Ny. : noyau spermatique, Ov. : ovocyte, P. : pores de l'acrosome. VA. : vésicule acrosomique, ZP : zone pellucide.

membrane spermatique (SED1) se lie alors au complexe glycoprotéique de la zone pellucide, liaison qui n'est possible qu'avec des ovocytes non fécondés. Trois constituants glycoprotéiques majeurs formant ce complexe ont été identifiés. Deux glycoprotéines, ZP2 et ZP3, forment des chaînes hétérodimériques à séquence répétée reliées entre elles par une troisième glycoprotéine ZP1. La fixation spécifique du spermatozoïde s'effectue au niveau de ZP3. Des galactosyltransférases de 60kD, ancrées dans la membrane plasmique périacrosomique du spermatozoïde, reconnaissent des résidus N-acétyl-glucosamine portés par ZP3 et se lient à ceux-ci.



ZP3 peut se lier avec au moins trois protéines de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Outre la galactosyltransférase déjà citée, deux autres constituants ont été identifiés chez la souris, une protéine de 56 kDa, la SP56, se fixant sur un galactose terminal de ZP3 et une kinase transmembranaire de 95 kDa, la SP95, qui développe une activité tyrosine kinase consécutive à l'établissement de la liaison avec ZP3. Ces récepteurs concourent non seulement à réaliser la fixation du spermatozoïde mais aussi à initialiser chez celui-ci, la réaction acrosomique.

Le rôle central de ZP3 dans la fixation du spermatozoïde est attesté par le fait que des spermatozoïdes incubés en présence de ZP3 extraits de zones pellucides voient leurs sites récepteurs saturés et perdent leur capacité de liaison. L'expérience reproduite avec les protéines ZP1 et ZP2 est sans effet.

Chez des Mammifères autres que la souris, de nombreuses similitudes sont observées concernant cette première étape de fixation, avec l'implication de molécules présentant de fortes homologies avec ZP3 de souris et des récepteurs spermatiques qui sont soit identiques à ceux qui ont été cités précédemment, soit différents (α -D-mannosidase au lieu de galactosyltransférase chez l'homme).

Il a été montré que de façon générale, aussi bien chez les Invertébrés que chez les Vertébrés, les groupements prosthétiques de glycoprotéines constituant l'enveloppe primaire ovulaire jouaient un rôle déterminant dans la reconnaissance et l'adhérence des spermatozoïdes. Ainsi des traitements d'ovules de différentes espèces par des lectines telle la concanavaleine A¹ les rendent non fécondables.

Le contact établi initialement dans la région apicale du spermatozoïde, s'étend progressivement à d'autres régions de sa tête par la mise en jeu d'un nombre croissant de récepteurs, ce qui amène le spermatozoïde à être couché sur la zone pellucide.

b) Réaction acrosomique

Les liaisons qui s'établissent entre un motif peptidique de ZP3 et les kinases transmembranaires spermatiques SP95 seraient à l'origine de l'agrégation suivie de l'activation de ces kinases. La réaction acrosomique semble directement liée à la stimulation de ces récepteurs membranaires et se trouve amorcée par une ouverture de canaux calciques. Celle-ci provoque la libération de Ca⁺⁺ intracellulaire qui favorise alors indirectement des fusions ponctuelles entre la membrane externe de l'acrosome et la membrane plasmique de la tête spermatique. Cette réaction est facilitée par les modifications préalables survenues dans la membrane plasmique au cours de la capacitation (voir § 2.4.2c). Ceci entraîne la formation de pores par lesquels sont libérées les enzymes contenues dans la vésicule acrosomique. Des échanges ioniques entre H⁺ cellulaire et Na⁺ du milieu extérieur provoquent localement une modification de pH qui favorise l'activation de ces enzymes (voir encart 4.2 et fig. 4.4).

c) Pénétration à travers la zone pellucide (fig. 4.2)

Suite à la réaction acrosomique, la membrane plasmique périacrosomique est désorganisée et les récepteurs portés par celle-ci ne peuvent plus maintenir la fixation de la tête spermatique à la zone pellucide. Cette fixation est alors assurée par un second type de liaison s'établissant entre ZP2 et un récepteur porté par la membrane interne de la vésicule acrosomique mise à nu au cours de la réaction acrosomique. Ce récepteur, PH20, primitivement identifié chez le cobaye, a été ensuite mis en évidence chez diverses espèces de Mammifères. Chez l'homme et la souris, c'est une protéine SPAM-1 (pour « SPerm Adhésion Molécule-1 ») présentant un haut degré de similitude avec PH20 qui a été identifiée.

Parmi les enzymes libérées lors de la réaction acrosomique, on peut citer l'hyaluronidase qui dégrade l'acide hyaluronique contenu dans la zone pellucide et l'**acrosine**, enzyme protéolytique qui après activation, déstabilise les liaisons existant entre les

1. Les lectines sont des protéines capables de se lier de façon spécifique à des oses de natures différentes. Elles sont utilisées entre autres pour localiser ou neutraliser des sites de glycoprotéines membranaires.

protéines ZP1, ZP2 et ZP3 en modifiant la conformation de ZP1 qui a une fonction de lien entre ZP2 et ZP3. La digestion locale de la zone pellucide au niveau de la zone de contact avec le spermatozoïde, permet d'aider la pénétration de ce dernier, celle-ci s'effectuant principalement par des mouvements mécaniques. S'insinuant par l'ouverture pratiquée dans la zone pellucide, le spermatozoïde entre en contact, au niveau de sa coiffe post-acrosomique, de façon tangentielle avec les microvillosités ovocytaires.

4.2.3 Fusion des gamètes

Au cours de ces dernières années, il a été montré que la fusion s'opérant entre les membranes des deux gamètes fait intervenir diverses protéines dont certaines ont des propriétés comparables à celles des protéines de fusion présentes chez certains virus (ex : protéines P du virus Sendai ou HA du virus de la grippe).

Chez l'oursin, la bindine serait susceptible de remplir ce rôle dans la mesure où a été observée, à son extrémité N-terminale, une séquence de résidus hydrophobes capable d'induire la fusion de vésicules phospholipidiques. Le récepteur membranaire ovulaire est apparenté à la famille des **hsp** (pour « heat shock protein » ou **protéines de choc thermique**).

Chez les Mammifères, le mécanisme de fusion entre les structures membranaires des deux gamètes est encore mal connu. Il est le résultat des interactions entre plusieurs molécules de la région équatoriale du spermatozoïde (zone de jonction des membranes plasmique et acrosomique interne) et de l'ovocyte, agissant conjointement, chacune d'elles étant nécessaire mais insuffisante pour assurer la fusion (voir encart 4.1).



ENCART 4.1 Quelques protéines de fusion des gamètes

– **CD9** est une protéine constitutive de la membrane de l'ovocyte avec plusieurs domaines transmembranaires et deux domaines extracellulaires. Elle appartient à la famille des tétraspanines dont les fonctions seraient de regrouper des protéines de la surface cellulaire, concentrant ainsi des sites actifs d'un type de molécule, comme des intégrines de la membrane de l'ovocyte, et d'augmenter ainsi leur réactivité.

Le rôle de CD9 dans la fécondation peut être montré par la technique de « knock-out » : des femelles chez qui le gène CD9 a été éliminé sont stériles, leurs ovocytes étant incapables de fusionner avec les spermatozoïdes. Leur mode d'action n'est pas connu.

– **Izumo**, une protéine de type immunoglobuline, (Inoue et coll., 2005), a été mise en évidence chez la souris comme chez l'homme, sur la paroi de la tête spermatique. Elle contribue à réaliser la fusion avec l'ovocyte ; l'emploi, *in vitro*, d'anticorps dirigés contre Izumo empêche cette fusion.

– Des protéines désignées sous le terme de **fertilines** sont présentes au niveau de la région post-acrosomique du spermatozoïde ; elles se lient à des intégrines de la membrane ovulaire et paraissent directement impliquées dans le processus de fusion. Elles appartiennent à la famille des protéines ADAMs.

ENCART 4.1 (suite)

– Les **ADAMs** (pour « **A Disintegrin And Metalloprotease proteins** ») forment une famille de protéines transmembranaires qui possèdent différents domaines extracellulaires assurant des fonctions de protéolyse, d'adhérence, de fusion et d'initialisation de signal. Actuellement 23 membres de cette famille moléculaire ont été décrits et/ou caractérisés, et certains d'entre eux sont directement impliqués dans le processus de la fécondation (Blobel et coll., 1992). Chez le cobaye, un hétérodimère, la **fertiline** ou protéine PH30, constitué de deux sous-unités α et β , est présent sur la membrane plasmique des spermatozoïdes. La sous-unité β (fertiline β ou ADAM 2) se lie à des intégrines exprimées au niveau de la membrane ovulaire. Parmi celles-ci a été caractérisée l'**intégrine $\beta 6$** . Par un processus coopératif, la sous-unité α (fertiline α ou ADAM 1) exposerait un segment hydrophobe susceptible de jouer le rôle d'un peptide de fusion. Chez la souris et l'homme, seule la sous-unité β a été identifiée.

Lorsque la fusion cellulaire a lieu, il se forme chez les Invertébrés tels les Échinodermes, un **cône de fécondation** : il est dû au développement local de microvillosités qui tapissent l'œuf. L'actine qu'elles contiennent se polymérise. Elles se contractent et entraînent un soulèvement de la membrane de l'ovule qui fusionne avec la membrane du spermatozoïde. Le cytoplasme ovulaire s'insinue sous la membrane commune et englobe les structures spermatiques : noyau et pièce intermédiaire. C'est dès ce moment que se forme l'œuf ou zygote.

Chez les Mammifères (fig. 4.3), la fusion a lieu entre la membrane latérale du spermatozoïde, en arrière de l'acrosome ouvert au niveau de la coiffe post-acrosomiale-

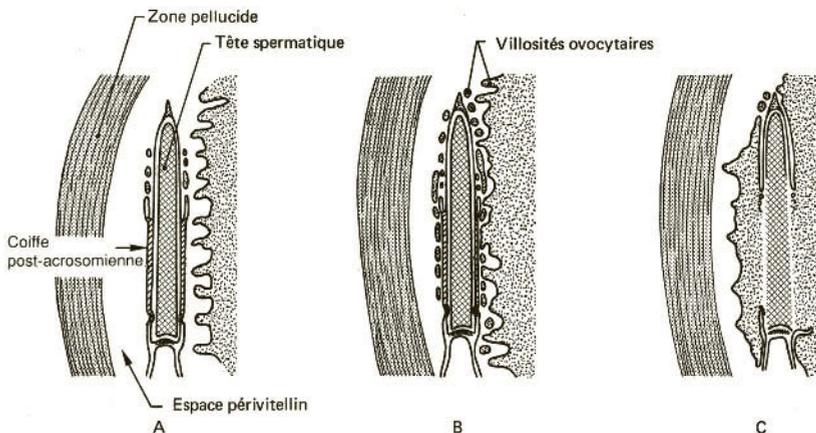


Figure 4.3 - Pénétration d'un spermatozoïde dans l'ovocyte de rat.

A : Le spermatozoïde est dans l'espace périvitellin, l'acrosome s'est ouvert lors du passage à travers l'enveloppe de l'ovocyte. **B** : Un contact s'établit entre microvillosités ovocytaires et la coiffe post-acrosomiale. **C** : Fusion membranaire, pénétration de la tête du spermatozoïde et de la pièce intermédiaire dans le cytoplasme ovocyttaire (d'après Piko', 1968).

que, et celle des villosités de l'ovocyte. Les limites des deux membranes plasmiques deviennent indistinctes et le cytoplasme ovocytaire entoure le noyau spermatique qui pénètre tangentiellement dans l'ovocyte.

Plus tard les organites de la pièce intermédiaire dégèrent à l'exception du **centriole proximal**. L'ensemble des réactions décrites paraît indispensable pour qu'un spermatozoïde soit fécondant ; s'il est injecté expérimentalement dans l'ovocyte, il se révèle incapable d'assurer une fécondation.

4.3 RÉACTIONS MEMBRANAIRES DE L'ŒUF

Cette étude est essentiellement basée sur des observations réalisées chez l'oursin. Quelques secondes après la pénétration du spermatozoïde, des phénomènes se manifestent au niveau de la membrane, qui engendreront non seulement une activation des processus métaboliques dans l'œuf mais aussi l'établissement de barrières contre la polyspermie. Les pénétrations multiples de spermatozoïdes seront évitées grâce à deux mécanismes : l'un rapide, par une modification du potentiel de membrane, l'autre plus lent, par la formation d'une membrane de fécondation due à l'exocytose de granules corticaux.

4.3.1 Modifications au niveau de la membrane ovocytaire et leurs conséquences

a) Modifications physiques

L'indice de réfraction du cortex de l'ovule d'oursin est modifié par l'entrée en contact avec le spermatozoïde. En effet, l'ovule vierge apparaît jaune sous le microscope à fond noir qui ne transmet que les rayons réfractés ; fécondé, il devient blanc. Le changement se manifeste au point de contact après 7 secondes et se propage à toute la surface ovulaire en 20 secondes.

Ces changements, indices d'une modification de structure du cortex, s'accompagnent d'une augmentation de viscosité du cytoplasme périphérique et d'une dépolarisation membranaire.

b) Flux ioniques et activation de l'œuf (fig. 4.4)

Le potentiel de repos de la membrane de l'œuf d'oursin vierge est négatif (- 80 millivolts), la face interne de la membrane étant électronégative par rapport à la face externe. La concentration interne de Na^{++} est faible, celle de K^+ élevée.

La fécondation provoque une série d'échanges ioniques transmembranaires Na^+/H^+ et Na^+/K^+ et une libération de Ca^{++} lié intracellulaire qui sont impliqués dans la formation d'une première barrière à la polyspermie et dans l'activation de l'œuf (voir encart 4.2).

c) Interprétation du rôle des flux ioniques

Ces flux ioniques paraissent résulter d'une cascade d'événements déclenchée selon des voies classiques de transduction de signaux. Nous décrirons la voie qui, décrite aussi dans d'autres cas d'activation cellulaire, se retrouve dans toutes les espèces

 ENCART 4.2

Nature et séquence des flux ioniques associés à l'activation de l'œuf

- *Premiers flux de Na^+ et de H^+*

La fécondation provoque une première augmentation de l'influx de Na^+ . Son intensité est maximale au bout de 1 minute, puis décroît ; la teneur en sodium se stabilise. Dans le même temps se produit une sortie d'ions H^+ suivant une cinétique parallèle à celle de l'influx de Na^+ (non représentée sur les graphiques).

- *Dépolarisation membranaire transitoire et blocage de la polyspermie*

Le flux de Na^+ contribue à provoquer une dépolarisation transitoire de la membrane ovulaire qui se transmet dès la 3^e seconde à partir du point de pénétration du spermatozoïde. Le potentiel de membrane s'élève alors à + 20 millivolts. Cette dépolarisation dure quelques minutes. Les spermatozoïdes sont alors incapables de fusionner avec la membrane de l'œuf et la polyspermie est provisoirement empêchée.

La membrane se repolarise ensuite lentement, modification due à une conductance au potassium qui pénètre activement dans les cellules.

- *Signification des variations Na^+/H^+*

La sortie de H^+ en compensant l'influx de Na^+ contribue à l'augmentation du pH intracellulaire qui passe de 6,6 à 7,2. L'alcalinisation du milieu cellulaire ainsi créée, associée à la libération de Ca^{++} , entraîne une dérépression des activités métaboliques (voir ci-dessous).

- *Évolution de la teneur en Na^+/K^+ de l'œuf*

Passé cette période initiale de quelques minutes, la résultante de l'influx et de l'efflux de Na^+ aboutit à une concentration intracellulaire maximale vers 10 minutes suivie d'une diminution progressive jusqu'à un niveau inférieur à celui de l'œuf vierge.

Cette perte de Na^+ est compensée par une pénétration de K^+ qui, au bout de 1 heure, atteint un maximum qui est de 20 % supérieur à celui de l'œuf vierge (fig. 4.4B).

- *Libération de Ca^{++} intracellulaire*

Après 20 secondes, la concentration en Ca^{++} libre dans le cytoplasme augmente brusquement, puis s'abaisse en 3 minutes. Cette augmentation transitoire a été démontrée dans plusieurs espèces après injection d'équorine dans les ovules. Cette substance n'est fluorescente qu'en présence de Ca^{++} . On a ainsi montré que la fécondation s'accompagne d'un bref accroissement de luminescence (10 000 fois après 1 minute chez un poisson), suivi d'un retour à son niveau d'origine. Ce calcium est d'origine intracellulaire, contenu en particulier dans le réticulum endoplasmique lisse.

Chez les Mammifères, l'élévation du taux de calcium se manifeste sous la forme d'un pic suivi, pendant plusieurs heures après la fécondation, d'oscillations espacées par des intervalles de temps réguliers.

Des augmentations de la perméabilité membranaire à l'eau, aux acides aminés et aux phosphates ont également été observées.

étudiées. Le contact du spermatozoïde avec l'ovule activerait indirectement une **phospholipase C (PLC)**. Chez l'oursin, il semblerait que ce soit la PLC γ activée par une kinase de la famille **src**. La PLC intervient dans l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP₂), ce qui entraîne la libération de deux seconds messagers, l'**inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)** et le **diacylglycerol (DAG)**. L'inositol triphosphate libéré dans le cytoplasme déclenche la libération de Ca⁺⁺ contenu dans le reticulum endoplasmique et des mitochondries.

Une autre modalité d'activation du flux calcique pourrait consister dans la micro-injection directe par le spermatozoïde de facteurs qui induiraient l'ouverture de canaux calciques. On propose aussi l'hypothèse d'un transfert massif de Ca⁺⁺ lors de la fusion du spermatozoïde et de l'ovule (théorie de la bombe à calcium), celui-ci pouvant provenir aussi du milieu extra-cellulaire ; cet influx déclencherait des oscillations calciques.

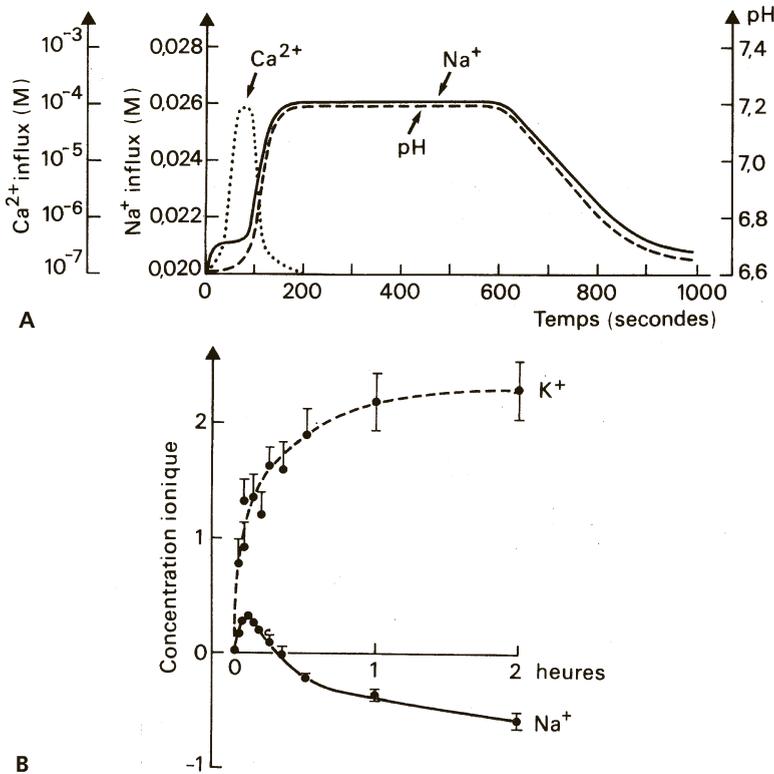


Figure 4.4 - Modifications des concentrations ioniques dans le cytoplasme de l'œuf d'oursin, après fécondation.

A : Variations immédiates de la concentration de Ca⁺⁺ libre et de Na⁺. Augmentation de pH partiellement liée à un efflux de H⁺ (d'après Epel, 1977). **B :** Variations des concentrations de Na⁺ et K⁺. Le Na⁺ excrété activement au bout de quelques minutes tombe au-dessous de son niveau dans l'œuf vierge. En échange, le K⁺ est pompé activement. Ordonnées : concentrations comparées à celle trouvée dans l'œuf vierge, qui est arbitrairement ramenée à 0 (d'après Girard et coll., 1982).

La vague de libération du calcium se propage dans toute la cellule. Un des premiers effets du calcium serait d'activer une enzyme, la **NAD⁺ kinase** qui convertit le NAD⁺ en NADP⁺. Cette étape est nécessaire pour la reprise des biosynthèses et de l'activité respiratoire. Il induit ensuite la fusion et l'exocytose des granules corticaux avec la membrane plasmique et déclenche la réaction corticale. Le Ca⁺⁺ lié à d'autres protéines réceptrices, comme la calmoduline, stimule d'autres protéines kinases qui provoquent à leur tour des phosphorylations et des réactions métaboliques.

Le diacylglycérol, second messenger produit par l'hydrolyse du phosphatidylinositol, et resté intégré dans la membrane, active une protéine kinase C, enzyme qui, en présence de Ca⁺⁺, stimule à son tour la protéine responsable des échanges transmembranaires Na⁺/H⁺. L'élévation de pH qui en résulte est indispensable pour stimuler les synthèses de protéines, la réplication de l'ADN et les mouvements cytoplasmiques liés aux premières étapes de la morphogénèse. D'autre part, la protéine kinase C active la pompe à calcium, une ATPase, et ramène le Ca⁺⁺ à son niveau de concentration d'origine. L'activation de la protéine kinase C déclencherait aussi la traduction des ARN-m de l'ovocyte et une reprise intense de la synthèse des protéines ainsi que la duplication de l'ADN.

La pénétration du spermatozoïde déclenche donc une série de réactions d'activation décrites aussi dans de nombreux systèmes cellulaires activés par des facteurs de croissance, par exemple. Ces modifications rapides de la surface de l'œuf forment d'autre part un obstacle provisoire et précaire à la pénétration d'autres spermatozoïdes. Cet obstacle est consolidé par la formation chez de nombreuses espèces d'une membrane de fécondation.

4.3.2 Formation de la membrane de fécondation : barrière à la polyspermie

Avec un certain retard, une seconde réaction caractérisée par l'extrusion du contenu des granules corticaux et la transformation de la membrane vitelline, protège l'œuf de pénétrations multiples de spermatozoïdes (voir encart 4.3).

a) Rappel de la structure corticale de l'œuf vierge (fig. 4.5)

Sous la membrane plasmique existent des **granules corticaux** d'origine golgienne, d'environ 0,1 à 0,5 µm de diamètre, qui contiennent des protéines, des protéoglycannes, et des protéases. Ces granules corticaux sont présents chez de nombreux groupes zoologiques. Chez les Vertébrés, on les connaît chez les Poissons osseux, les Amphibiens Anoures et des Mammifères (ex : lapin, rat, hamster, homme).

b) Formation d'une membrane de fécondation

À partir du point de pénétration du spermatozoïde se forme une membrane de fécondation. Elle est le résultat de la transformation de la membrane vitelline sous l'action du contenu des granules corticaux. Cette membrane se soulève à partir du point d'impact du spermatozoïde. Chez les Mammifères, il ne se forme pas de membrane de fécondation, mais la zone pellucide subit des modifications.



La polyspermie est létale en général, si elle est suivie d'amphimixie. Cependant, elle est la règle chez certaines espèces possédant des œufs télolécithes, mais alors les spermatozoïdes surnuméraires se perdent dans le vitellus. Chez les Urodèles où la polyspermie est aussi la règle (triton, salamandre), tous les noyaux spermatiques paraissent évoluer normalement jusqu'à ce que le plus proche du pronucleus femelle fusionne avec celui-ci. Aussitôt, les autres dégèrent de proche en proche.

Chez les Mammifères, exceptionnellement, un certain développement peut se produire après fécondation par 2 spermatozoïdes. L'embryon dégère au cours de la gestation. Cependant, dans un cas très particulier, l'embryon peut être viable. En effet lors de la division II de méiose, le second fuseau de division peut être dévié de sa position normale, entraînant alors la formation de deux cellules plus ou moins égales au lieu d'un ovotide et un globule polaire. Un second spermatozoïde peut pénétrer dans cet équivalent du globule polaire et les deux cellules en étant fécondées peuvent donner lieu au développement d'un individu normal « chimère ». (Un autre mode de formation possible de chimère est aussi décrit avec les régulations des excédents, § 12.3.4c).

- *Ouverture des granules corticaux (fig. 4.5)*

Les membranes des granules corticaux qui sont nombreux (environ 15 000 chez l'oursin), fusionnent avec la membrane plasmique de l'œuf. Le flux de calcium libéré précédemment est indispensable aux contractions des microfilaments d'actine du cytoplasme cortical et à la fusion entre membrane des granules et membrane plasmique. Les granules s'ouvrent et leur contenu est déversé entre la membrane plasmique et l'enveloppe vitelline. Du liquide est émis sous l'enveloppe vitelline par l'œuf qui se contracte, créant ainsi un **espace périvitellin**. Il s'agit en quelque sorte d'une réaction en chaîne qui se propage plus ou moins rapidement suivant les espèces : chez l'oursin, elle se déclenche 30 secondes après l'entrée en contact du spermatozoïde et dure 20 secondes. Chez la grenouille elle dure environ 1 heure.

- *Devenir du contenu des granules corticaux*

A la suite de l'ouverture des granules, différents constituants sont libérés dans l'espace inter-membranaire. Une protéine à activité peroxydasique s'insère dans la membrane vitelline et en provoque le durcissement en induisant des ponts tyrosine entre ses constituants protéiques. Une autre enzyme à activité de type trypsinique détruit les liaisons entre la membrane plasmique et la membrane vitelline ainsi que les sites récepteurs des spermatozoïdes situés sur la face externe de cette dernière. Des glycosaminoglycannes sont également libérés et créent un gradient osmotique qui se traduit par un appel d'eau et la formation de l'espace périvitellin. Cette eau provient du milieu extérieur et aussi de l'ovocyte dont le volume diminue fortement (diminution de près d'un tiers chez les Mammifères). Enfin, une dernière fraction, glycoprotéique, reste accolée à la membrane plasmique et forme la couche hyaline qui contribue, en s'épaississant, à maintenir entre eux les blastomères lors de la segmentation. Cette couche n'est pas connue chez les Amphibiens.

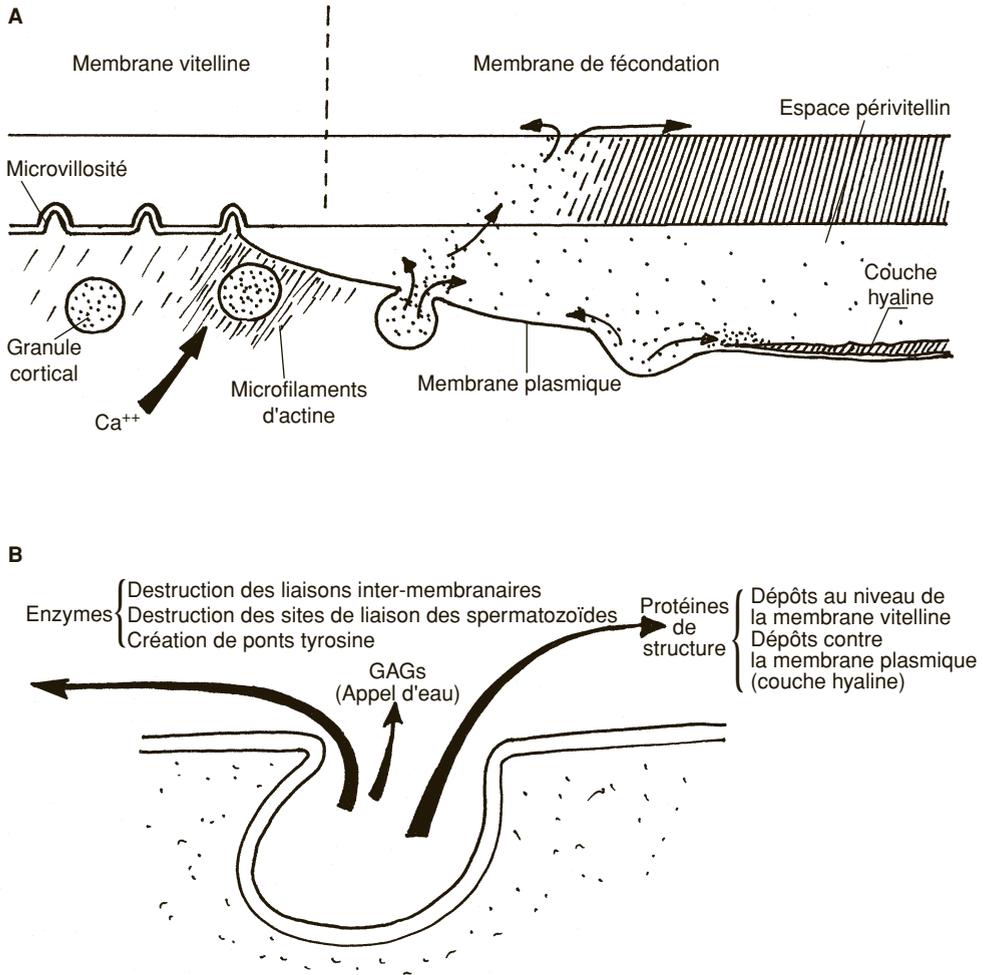


Figure 4.5 - Formation d'une membrane de fécondation.

A : De gauche à droite, les granules corticaux s'ouvrent et leur contenu se répand dans l'espace périvitellin qui s'agrandit. La membrane vitelline se transforme en membrane de fécondation. Une couche hyaline (chez l'oursin) s'étale à la surface de la membrane plasmique. **B :** Détail des fonctions exercées par les composants des granules corticaux libérés lors de la fécondation.

- *Transformation de la membrane vitelline en membrane de fécondation imperméable aux spermatozoïdes*

Des travaux sur des membranes vitellines d'œufs vierges de xénope montrent qu'elles sont aisément pénétrées par les spermatozoïdes et dissoutes par la trypsine, tandis que la membrane de fécondation n'est ni dissoute ni traversée. Sa face externe modifiée par la sécrétion des granules corticaux est la plus résistante (Grey et coll., 1976). Chez les Oursins, cette partie externe contient en outre la protéase qui contri-

bue à détacher les spermatozoïdes encore attachés à la membrane de fécondation en digérant ou en dénaturant les sites récepteurs à la bindine des spermatozoïdes sur la membrane vitelline (Carroll, 1975). C'est l'interprétation qu'on peut donner des images de la membrane de fécondation dépourvue de spermatozoïdes autour du point de fécondation, chez l'oursin.

Des enzymes jouant des rôles analogues ont été mises en évidence chez le hamster et la souris. Une glucosaminosidase clive la N-acétylglucosamine, site actif de fixation à la glycoprotéine ZP3, cependant que des protéases dégradent ZP2 (Florman et Wassarman, 1985 ; Moller et Wassarman, 1989).

Ainsi, suite à ces transformations membranaires, se crée une imperméabilité aux spermatozoïdes, phénomène probablement très général.

- *Rôle de l'espace périvitellin*

Le contenu des granules corticaux qui est resté présent dans l'espace périvitellin et qui s'est imbibé d'eau, joue aussi un rôle protecteur contre la polyspermie. Si, par exemple, la couche hyaline qui recouvre l'œuf d'oursin est enlevée, l'œuf peut être fécondé à nouveau.

On notera cependant que des œufs d'Oursins dont l'émission du contenu des granules corticaux est inhibée expérimentalement, peuvent se développer normalement.

- *Différences de modalités selon les espèces*

Chez les Mammifères, la libération du contenu des granules corticaux dans l'espace périvitellin est très rapide lors de la fécondation, ce qui expliquerait la rareté des observations. De façon générale, il existe déjà un espace périvitellin sous la zone pellucide au moment de la ponte ovulaire.

En fait, la formation d'une membrane de fécondation ne semble pas être un événement généralisable. Cela peut être imputé notamment à l'absence de granules corticaux tel que cela existe dans certains taxons (exemple chez les Insectes, les Amphibiens Urodèles, les Sauropsidés). Cependant la membrane de fécondation ne se forme pas non plus chez les Mollusques dont les œufs possèdent des granules. Il a été montré chez les Amphibiens Urodèles, que la pénétration du spermatozoïde provoquait, par suite d'activations enzymatiques, une dissociation entre la gangue et la membrane vitelline, détachant ainsi l'œuf de son enveloppe la plus externe. Ceci a pour conséquence de constituer un obstacle pouvant limiter la polyspermie et de permettre surtout à l'œuf de s'orienter sous l'effet de la pesanteur. Ce dernier fait revêt une importance considérable pour le déroulement futur de l'embryogenèse (voir § 4.5.1 et chap. 8).

4.4 RÉTABLISSEMENT DE LA DIPLOÏDIE PAR FUSION DES PRONUCLEI (fig 4.6)

Les deux divisions de méiose doivent être achevées, et les deux globules polaires émis avant que les noyaux mâle et femelle fusionnent. La fusion des noyaux ou **amphimixie** dure moins de 1 heure chez les Oursins, 12 heures chez les Mammifères.

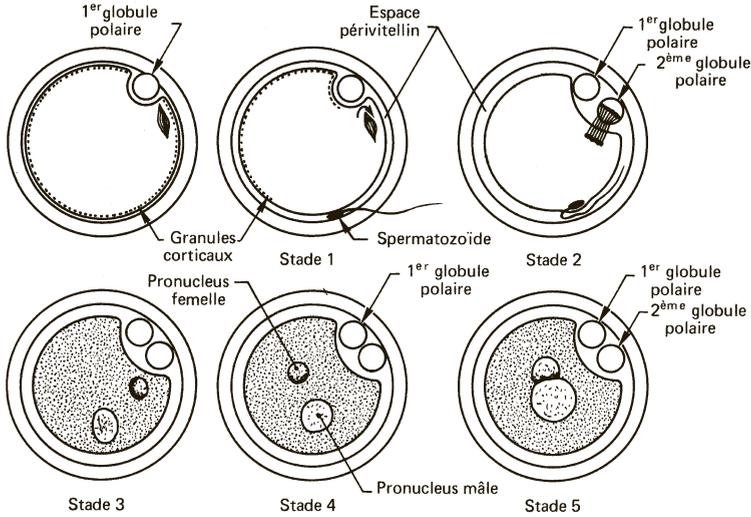


Figure 4.6 - Fécondation d'un œuf de Mammifère (lapin).

Stade 1 : Pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte, éclatement des granules corticaux, rotation du fuseau de 2^e division de méiose. **Stade 2** : Émission du 2^e globule polaire. **Stades 3-4-5** : Formation des pronuclei, amphimixie. Le pronucleus mâle est le plus volumineux.

4.4.1 Formation des pronuclei et du spermaster

Chez les oursins, le noyau spermatique pénètre dans le cytoplasme ovulaire et subit comme dans la plupart des espèces, une rotation de 180° amenant ainsi le centriole proximal en avant du noyau. Les autres parties du spermatozoïde encore éventuellement visibles perdent leurs connexions avec le noyau et le centriole. L'enveloppe nucléaire est partiellement désorganisée par suite de la phosphorylation affectant les lamines, protéines structurales associées à la membrane nucléaire interne. Le noyau se gonfle (550 fois chez le rat), il devient le **pronucleus mâle**. Au cours de ce phénomène, les histones spermatiques sont remplacées par des histones ovocytaires et la chromatine devient finement fibrillaire. Chez les Mammifères, les protamines (protéines basiques caractéristiques du noyau du spermatozoïde, voir § 2.3.2a) sont éliminées de la chromatine et remplacées par des histones synthétisées dans l'ovocyte.



Chez la souris, on a pu mettre en évidence cette élimination des protamines en injectant à un mâle adulte un acide aminé radioactif abondant dans les protamines. Il s'incorpore dans ces dernières dans les cellules germinales. On obtient ainsi des spermatozoïdes au noyau fortement radioactif. Après fécondation et pénétration d'un de ces spermatozoïdes, le noyau mâle perd progressivement sa radioactivité qu'on retrouve dans le cytoplasme ovulaire (Kopečný et coll., 1975).

Pendant la période de gonflement, le centriole spermatique devient le centre de formation d'un aster, le **spermaster**. Le noyau femelle achève éventuellement sa méiose (2^e division chez les Vertébrés) avec une émission de globule(s) polaire(s), et

grossit sensiblement. Devenu le **pronucleus femelle**, il se dirige vers la zone de fusion avec le pronucleus mâle et vient s'y accoler étroitement. Le centriole femelle a été éliminé avec la dernière division de méiose. Il faut toutefois noter que cette origine exclusivement mâle du centriole n'est pas aussi nette chez les Mammifères.

Le gonflement des noyaux s'accompagne d'une reprise des activités de synthèse, en particulier d'une replication d'ADN rendue possible par la décondensation de la chromatine. Si on fait incorporer de la thymidine ^3H à des ovocytes, on constate que l'incorporation reprend dans les pronuclei mâle et femelle avant l'amphimixie, l'équipement enzymatique nécessaire à la duplication étant présent dans l'ovocyte. La duplication de l'ADN achevée, l'amphimixie peut avoir lieu et la première mitose pourra commencer immédiatement.

4.4.2 Fusion des noyaux, ou amphimixie

Dans les œufs sans réserves, comme ceux des Oursins ou des Mammifères, les deux noyaux migrent vers le centre de l'œuf. Dans les œufs hétérolécithes (Amphibiens) ou télolécithes (Oiseaux), la fusion se fait dans la région du pôle animal.

Le centriole proximal formant le spermaster se duplique et constitue l'**amphiaster**. Les deux asters le constituant se séparent et migrent vers les deux régions qui constitueront les deux pôles du premier fuseau mitotique. Les deux noyaux fusionnent avec formation d'une enveloppe unique. Les chromosomes paternels et maternels s'individualisent à nouveau, ils s'apparient et s'organisent à l'équateur du fuseau achromatique au moment de la première division. Chez les Mammifères, les chromosomes des deux pronuclei se condensent et forment une plaque métaphasique sans fusion préalable des noyaux.

4.5 CONSÉQUENCES DE LA FÉCONDATION DU POINT DE VUE STRUCTURAL ET MÉTABOLIQUE

4.5.1 Remaniements structuraux

La pénétration du spermatozoïde dans l'ovule provoque un certain nombre de réactions qui sont :

- Un achèvement de la méiose si elle n'était pas achevée avant la pénétration du spermatozoïde et l'émission des globules polaires.
- Une réaction corticale et la formation de la membrane de fécondation. Comme celle-ci est accompagnée d'une rétraction sensible de l'œuf qui devient libre dans ses enveloppes, celui-ci, s'il possède des réserves vitellines plus lourdes dans l'hémisphère végétatif, va s'orienter selon la pesanteur avec son hémisphère végétatif orienté vers le bas. C'est la **rotation d'orientation** (ou **d'équilibration**). Elle dure 30 minutes à 18 °C chez les Amphibiens (voir § 8.5.3).
- Des remaniements cytoplasmiques qui sont assez généraux. Chez les Oursins (par exemple *Paracentrotus lividus*), le cytoplasme cortical de l'œuf mûr contient des pigments orangés largement répartis dans l'hémisphère végétatif. Après la fécondation, ils se rétractent en une large bande subéquatoriale. Chez les Amphibiens,

la tache claire de maturation au pôle animal disparaît sous l'effet d'une contraction du cytoplasme cortical. Plus tard, des remaniements intéressant le cortex et le cytoplasme profond de l'aire végétative dorsale se manifestent extérieurement par l'apparition d'un **croissant dépigmenté** à l'opposé du point de pénétration du spermatozoïde (voir § 8.1.4).

4.5.2 Changements métaboliques

a) Modifications de l'activité respiratoire

L'activité respiratoire dans les œufs vierges est variable suivant les groupes zoologiques; elle est très faible chez les Oursins. La fécondation la stimule de l'ordre de 3 à 5 fois en activant des enzymes : la libération de Ca^{++} intracellulaire active d'une part la NAD-kinase qui catalysera, dès la réaction corticale, la synthèse de NADP à partir de NAD et d'ATP, et d'autre part les cytochromes oxydases. Chez la grenouille et d'autres Vertébrés, par contre, le taux respiratoire n'est pas modifié. Par ailleurs une élimination anormalement élevée de CO_2 est notée dans certains groupes comme les Oursins et les Amphibiens ; la fécondation paraît donc avoir pour effet d'activer l'élimination des déchets du métabolisme accumulés dans l'œuf vierge, plus ou moins en état d'anoxie.

b) Synthèses d'ADN et activation des mitoses

Elles ont été évoquées précédemment. L'effet inhibiteur dû au facteur cytotatique (voir § 3.4.2b) est levé. C'est le cytoplasme qui contrôle les reprises de synthèses d'ADN. Ce contrôle est démontré en injectant dans l'œuf fécondé des noyaux de cellules adultes qui ne se divisent pas (voir § 16.3). Ces noyaux recommencent à incorporer de la thymidine ^3H . En effet, le cytoplasme de l'ovocyte est riche en ADN polymérase, en thymidine kinase ainsi qu'en cyclines. Ces protéines qui proviennent de la traduction des ARN-m maternels, sont nécessaires au déroulement de la mitose ; elles sont présentes à chaque métaphase et sont dégradées à chaque division. Ces molécules migrent du cytoplasme vers le noyau pendant les divisions de la blastula. Les spermatozoïdes de certaines espèces possèdent également une ADN polymérase endogène.

c) Synthèses d'ARN

On ne détecte pas d'augmentation notable de synthèses d'ARN.

d) Déclenchement des synthèses de protéines

Après la fécondation et pendant la segmentation qui suit, les synthèses de protéines sont actives, ainsi qu'on le verra en étudiant les synthèses pendant la segmentation (voir chap. 12).

Le début de ces synthèses ne dépend pas toujours de la fécondation. Chez les Oursins, l'œuf vierge a achevé sa méiose et se trouve au repos métabolique. La fécondation joue ici le rôle de réactivateur des synthèses. Chez les Amphibiens et les Vertébrés dont l'œuf n'achève pas la méiose avant la fécondation et dont la ponte peut être différée par la femelle dans la recherche de conditions écologiques convenables, une faible synthèse de protéines a débuté à la maturation ; la fécondation ne fait que l'amplifier. Chez les Mammifères, la fécondation suit la maturation après un

délai précis de l'ordre de quelques heures. C'est la maturation qui stimule la reprise de synthèses, on ne note pas d'amplification à la fécondation.

e) Mécanismes d'activation des synthèses de protéines

Ce sont des ARN transcrits pendant l'ovogenèse qui sont traduits. En effet, un inhibiteur de synthèses d'ARN tel l'actinomycine D, administré lors de la fécondation chez l'oursin par exemple, ne modifie pas l'activation des synthèses de protéines. Nous avons vu dans l'étude de l'ovogenèse que toutes les catégories d'ARN sont stockées dans le cytoplasme de l'ovocyte et on a identifié bon nombre d'ARN-m non fonctionnels dans les œufs mûrs de différentes espèces (transcrits de tubuline, d'actine, d'histones, d'enzymes, de facteurs de croissance, de facteurs de transcription, etc.).

Cependant, il y a peu de polyribosomes dans les œufs vierges : 90 % des ribosomes sont libres dans l'ovocyte et disponibles pour la formation des polyribosomes. En revanche, 40 min à 2 heures après la fécondation, 25 à 50 % des ribosomes sont inclus dans les polyribosomes chez l'oursin. Les ARN-m s'associent donc activement aux ribosomes dès la fécondation.

Plusieurs mécanismes sont proposés qui expliquent à la fois les modalités de la neutralisation de ces messagers dans l'œuf vierge et de l'activation de leur lecture dès la fécondation (ou parfois lors de la maturation). Ils ont été démontrés sur différents modèles, mais ne s'excluaient pas mutuellement et pourraient être simultanés (voir encart 4.4).



ENCART 4.4 Mécanismes possibles du contrôle de la traduction des messagers de l'œuf vierge

- *L'état de polyadénylation d'un ARN-m peut conditionner sa traduction ou sa stabilité dans l'ovocyte et l'œuf fécondé.*

Ceci a été montré initialement chez la souris et le xénope, avec quelques variantes dans les mécanismes de fonctionnement et également chez des Invertébrés comme *Spisula* (Mollusque).

On rappellera que les ARN-m sont dotés à leur extrémité 3' d'une séquence plus ou moins longue de nucléotides qui sont identiques, la séquence poly (A), et que la durée de vie d'un messager est en relation avec la longueur de cette séquence : le messager de la globine, par exemple, est très stable et a une queue poly (A) importante.

Pendant l'ovogenèse, une séquence de quelques centaines d'adénylates subsiste chez les ARN-m qui sont traduits en protéines dans l'ovocyte ; par contre, le raccourcissement de la séquence poly (A) réprime temporairement l'aptitude des autres ARN-m à être traduits. À ce stade ils restent muets et stables. Dans les ovocytes d'Amphibiens, les terminaisons 5' et 3' de nombreux ARN-m non traduits sont reliées par une protéine **maskin**, ce qui rend le site d'initiation de la traduction inaccessible (Mendez et Richter, 2001). Cette protéine est liée à l'extrémité 3' non traduite (3'UTR) par une protéine de liaison à l'élément de contrôle de l'adénylation, la séquence UUUUAU ; à l'extrémité 5', elle est liée au facteur initiateur de la traduction. De cette façon, l'ARN-m ne peut ni être adénylé ni être traduit, le facteur d'initiation ne pouvant effectuer la liaison à une petite sous-unité ribosomique.

 ENCART 4.4 (suite)

Au moment de l'ovulation, les processus d'allongement de la queue poly (A) et de libération de l'extrémité 5' sont engagés. Une kinase activée par la progestérone phosphoryle la protéine de liaison entre maskin et la séquence UUUUUAU. Cette protéine de liaison peut alors se lier à une cycline dont la synthèse est aussi fonction de la maturation; celle-ci se complexe avec une poly (A)-polymérase qui allonge la queue poly (A). Une autre protéine de liaison se lie alors à poly (A); elle détache maskin du facteur d'initiation de la traduction en 5'. La petite sous-unité du ribosome peut alors être positionnée en 5' sur l'ARN-m et la traduction peut s'amorcer. Si les liens entre la maturation et l'adénylation sont établis, on ne comprend pas encore clairement la raison pour laquelle les ARN-m à courte séquence poly (A) n'amorcent pas leur traduction.

- *Dans l'ovocyte, des modifications au niveau des extrémités 5' ou 3' pourraient rendre les ARN-m intraduisibles*

Par exemple, une 7-méthylguanosine est indispensable en 5' chez les Eucaryotes pour permettre la liaison de l'ARN-m à la sous-unité ribosomique et amorcer la traduction. Chez un Insecte, la chenille à corne du sphinx du tabac, on a montré que cette base n'était pas méthylée dans les ARN-m de l'ovocyte et ceux-ci ne sont pas traduits dans un milieu acellulaire^a. La méthylation survient à la fécondation, rendant ainsi ces ARN-m traduisibles dans le même système expérimental.

- *Une compartimentation intra-ovocytaire peut empêcher la formation de polyribosomes*

C'est le cas des ARN-m codant pour les histones qui restent dans le nucléoplasme de l'ovocyte d'oursin jusqu'à l'éclatement de la vésicule germinative à la fécondation (DeLeon et coll., 1983). D'autres ARN peuvent être l'objet d'une séquestration dans le cytoplasme même, en se trouvant notamment associés au cytosquelette par leur région non traduite en 3'.

- *L'élévation du pH intracellulaire est un événement essentiel dans la reprise de la synthèse des protéines*

On peut le mimer en traitant des œufs avec une solution alcaline contenant des ions NH_4^+ pénétrant à travers la membrane sous la forme NH_3 ; ils capturent H^+ dans le cytoplasme pour reformer NH_4^+ , augmentent le pH intracellulaire, ce qui élève le taux de synthèse des protéines et provoque la duplication de l'ADN (Winkler et coll., 1980).

- *La traduction de tous les ARN-m préformés ne commence pas simultanément à la fécondation*

Au cours des premières heures, l'association des ARN-m en polyribosomes est sélective et donc la nature des protéines synthétisées n'est pas quelconque; l'examen chez l'oursin des profils de sédimentation des polyribosomes à différentes heures après la fécondation montre une évolution dans la taille des polyribosomes, donc dans la nature des messages traduits. Ainsi, apparaissent dans l'ordre : la ribonucléotide réductase (après une heure), les enzymes de l'éclosion et les histones suivant les besoins en chromatine.

^a On prépare un milieu acellulaire à partir de broyats de *E. coli* ou de germes de blé contenant les ribosomes, les ARN-t, les acides aminés et les enzymes nécessaires à la synthèse de protéines. Ces protéines sont synthétisées lorsqu'on ajoute un extrait cellulaire contenant des ARN-m. La méthode permet de tester la présence d'un ARN-m donné par l'identification de la protéine synthétisée.

f) Utilisation des macromolécules des réserves

Chez les Oursins, on a pu montrer, dès la fécondation, une augmentation de la glyco-génolyse, une diminution de la quantité de protéines et de la teneur en lipides phosphorés, événements qui pourraient être liés à une utilisation des réserves dès l'activation. Très rapidement d'ailleurs, les synthèses nouvelles de phospholipides et de protéines pendant la segmentation compensent ces dégradations.

4.6 LA PARTHÉNOGÈSE

La parthénogenèse est l'aptitude d'un œuf à se développer sans fécondation Elle existe à l'état naturel, notamment chez de nombreux Arthropodes (Insectes : pucerons, abeilles, phasmes... Crustacés : daphnies, artémies, cloportes...), mais aussi chez quelques rares espèces de Vertébrés. Les cas de parthénogenèse naturelle ne seront pas abordés ici.

Elle peut être provoquée expérimentalement chez des espèces où la fécondation est la règle, c'est le cas d'Oursins et d'Amphibiens, et l'interprétation des résultats obtenus a permis d'en connaître les mécanismes.

4.6.1 Expériences de parthénogenèse expérimentale

De nombreux travaux sur les Oursins ont montré depuis Lœb (1899) que des agents chimiques très divers peuvent déclencher un développement parthénogénétique.

Certaines substances tels des ionophores, en augmentant la perméabilité membranaire à des ions Ca^{++} , peuvent entraîner une activation parthénogénétique : achèvement de la méiose, déchargement du contenu des granules corticaux, activation de l'œuf (exemples chez les Oursins, les Amphibiens, le hamster). Ainsi, ajouté à de l'eau de mer appauvrie ou non en Ca^{++} , l'ionophore A23187 provoque dans des ovules d'Oursins, une concentration du Ca^{++} cytosolique 20 fois supérieure à celle observée chez des ovules non traités. Cette augmentation résulte d'une libération de Ca^{++} endogène associé à des compartiments cellulaires. La pénétration du spermatozoïde produit le même effet (Steinhard et Epel, 1974) (voir § 4.3.1b et fig.4.4).

Bataillon (1910) obtient des développements parthénogénétiques sur l'œuf de grenouille par piqûres :

Des œufs vierges et lavés de *Rana temporaria* sont piqués avec un stylet de verre : le second globule polaire est émis, il se forme un monoaster, mais on n'observe pas de division donc pas de développement ultérieur.

Il obtient par contre des développements complets à partir d'œufs non lavés, souillés de sang lors de l'ouverture des oviductes. Sachant que les hématies d'Amphibiens sont nucléées, l'expérience est reprise systématiquement avec un stylet souillé d'éléments sanguins sélectionnés : avec des hématies de cheval qui sont anucléées il n'obtient que 1 % de développement, avec des leucocytes, 70 %. Il en déduit que des éléments présents dans les cellules nucléées sont nécessaires pour permettre un développement normal. Des travaux plus récents montrent que les éléments cellulaires

actifs se trouvent dans une fraction cytoplasmique sédimentable à 10 000 g, contenant de gros granules et notamment les mitochondries et les centrioles. L'activité de cette fraction disparaît par traitement à la colchicine qui désagrège les microtubules.

Des développements parthénogénétiques d'œufs de xénope ont été obtenus après injection de centrosomes isolés à partir de cellules lymphoïdes humaines à différentes phases de leur cycle de réplication : G0, G1 et G2. Le cytoplasme de l'œuf stimule la duplication de ces centrosomes, et la segmentation peut alors commencer (Tournier et coll., 1989).

4.6.2 Interprétation de ces expériences

Ces travaux de parthénogenèse expérimentale ont permis de comprendre les rôles que joue le spermatozoïde dans la fécondation :

- Il induit l'**activation** de l'œuf, par action superficielle au niveau de récepteurs membranaires, selon un processus analogue à celui qui est provoqué par un élément chimique ou un facteur de croissance,
- Il permet d'autre part la formation d'une figure mitotique dicentrique par l'apport indispensable du centriole : c'est la **régulation astérienne**.
- Il apporte enfin le matériel génétique rétablissant ainsi la diploïdie. C'est la **régulation chromosomique** (cette régulation peut se produire de diverses manières dans les cas de parthénogenèse naturelle : absence d'émission du second globule polaire par exemple). C'est la condition nécessaire pour que le développement parthénogénétique puisse se poursuivre, l'état haploïde étant peu observé chez les Métazoaires car rarement viable. Ainsi, les parthénogénotes mâles chez l'abeille *Apis mellifera*, les faux-bourçons, ne conservent une haploïdie qu'au niveau des cellules germinales, les tissus somatiques étant diploïdes, voire polyploïdes.

Résumé

La fécondation est un événement commun à la plupart des espèces, animales ou végétales, si l'on néglige ici celles où la parthénogenèse naturelle existe de façon régulière ou seulement dans des conditions d'environnement exceptionnelles.

On peut retenir des caractéristiques générales applicables à toutes les espèces.

Une densité suffisante en gamètes des deux sexes émis simultanément est le plus souvent nécessaire ; elle est acquise grâce à des mécanismes du comportement propres à chaque espèce, qui provoquent la rencontre des partenaires et l'émission des gamètes dans un environnement propice. Les adaptations les plus efficaces sont les modes de fécondation interne.

La fécondation n'est possible que si des mécanismes de reconnaissance, d'adhérence et de fusion cellulaires fonctionnent et ceci uniquement entre gamètes de même espèce ou d'espèces très proches. Ces mécanismes ont des caractères communs à toutes les espèces.

Résumé

Les risques de polyploïdie qui résulteraient de pénétrations multiples de spermatozoïdes, sont évités en faisant appel le plus souvent à des modifications de la surface de l'ovule (échanges ioniques, disparitions de récepteurs etc.) et/ou des structures périovulaires après la pénétration d'un premier spermatozoïde.

L'activation déclenchée par l'entrée du gamète mâle provoque un réveil de l'ovule où la plupart des activités étaient à l'état de veille (méiose inachevée, synthèses de protéines réduites ou nulles) alors que la cellule se trouve pourvue, plus que toute autre cellule somatique de la même espèce, des équipements nécessaires pour assurer les diverses fonctions métaboliques.

La fusion des pronucléi rétablit la diploïdie et assure la combinaison de deux génomes avec toutes les conséquences favorables qu'assure cet état, notamment en garantissant la diversité génétique de l'espèce. Ceci n'est cependant pas toujours indispensable comme le montrent les cas de parthénogenèse chez certaines espèces.

Questions

- 4.1 À quoi la réaction acrosomique correspond-elle ?
- 4.2 Existe-t-il un phénomène de capacitation lors d'une fécondation externe ?
- 4.3 À quel(s) constituant(s) de la zone pellucide les spermatozoïdes se fixent-t-ils ?
- 4.4 Comment la membrane de fécondation se forme-t-elle chez l'oursin ?
- 4.5 Fertiline et fertilisine sont-ils des termes synonymes ?
- 4.6 À quel moment peut-on observer une hyperactivation des spermatozoïdes ?
- 4.7 Quels sont les processus empêchant les cas de polyspermie ?
- 4.8 Quand l'amphimixie a-t-elle lieu ?
- 4.9 Quels phénomènes observe-t-on au niveau de la membrane ovocytaire lors de la fécondation ?

Réponses page 382

PARTIE 2

EMBRYOLOGIE DESCRIPTIVE

Nous décrirons brièvement les premiers stades du développement dans cinq groupes zoologiques.

- *Chez les Oursins*

L'embryogenèse des Oursins constitue un modèle simple de développement qui sert de base pour de multiples approches expérimentales et pour la compréhension de mécanismes aux niveaux cellulaire et moléculaire.

- *Chez les Insectes*

La drosophile est prise pour modèle ; en effet, des notions élémentaires sur les premières phases du développement de cette espèce sont nécessaires pour exposer ensuite les principes du fonctionnement des gènes de segmentation et des gènes sélecteurs homéotiques de développement. La présence de gènes équivalents a été retrouvée dans l'ensemble des groupes zoologiques étudiés à ce sujet.

- *Chez les Amphibiens*

La connaissance du développement des Amphibiens a permis une approche fructueuse pour la compréhension des déterminations précoces et des mécanismes de l'induction, et pour l'étude de la morphogenèse des autres Vertébrés.

- *Chez les Oiseaux*

Comparé aux exemples précédents de développement, celui des Oiseaux présente de profondes modifications liées à l'accumulation importante de réserves vitellines et à

Partie 2 • Embryologie descriptive

la mise en place de structures transitoires, les annexes embryonnaires qui permettent à l'embryon un développement autonome en milieu aérien terrestre et dépourvu d'une phase larvaire.

- *Chez les Mammifères placentaires*

Les œufs étant quasiment dépourvus de réserves vitellines, les embryons puisent leurs substances nutritives dans la circulation sanguine maternelle. Pour ce faire, les embryons élaborent rapidement des annexes embryonnaires, homologues de celles des Oiseaux ou des Reptiles, contribuant notamment à la formation du placenta. Ce dernier assurera les échanges fœto-maternels nécessaires à la viviparité.

- 5.1 Segmentation
- 5.2 Gastrulation
- 5.3 Organogenèse

Lorsqu'un œuf a été fécondé ou activé parthénogénétiquement, sa segmentation débute. Trois¹ feuillet, ectoderme, mésoderme et endoderme se mettent en place selon les grands axes de polarité de l'embryon lors de la gastrulation et la neurulation. La différenciation progressive des organes ou organogenèse constitue la fin du développement.

5.1 SEGMENTATION

L'embryon qui se segmente est une **blastula**. Elle est le siège d'une activité mitotique intense pour former un organisme multicellulaire sans accroissement de volume par rapport à l'œuf. Dans chaque cellule, le rapport nucléo-cytoplasmique se rapproche de la normale des cellules des tissus de l'espèce. Au sein de la blastula apparaît une cavité de segmentation ou **blastocèle**. Les éléments constitutifs du cytoplasme initial ne subissent pas de grands déplacements, mais se répartissent de manière souvent inégale entre les cellules filles ou **blastomères**.

5.1.1 La nature des œufs détermine le type de segmentation

Le mode de segmentation est fonction de la quantité de réserves en vitellus que l'œuf aura accumulée pendant l'ovogenèse. On distingue à cet égard plusieurs catégories d'œufs.

- Les œufs **alécithes**, sans réserves vitellines (Mammifères vivipares).
- Les œufs **oligolécithes**, avec de très faibles réserves vitellines (Oursins).
- Les œufs **hétérolécithes**, aux réserves relativement importantes et inégalement réparties qui n'empêchent pas une segmentation totale (Amphibiens, esturgeon, Annélides).

1. Deux chez certains embranchements. Voir § 5.2.

- Les œufs **télolécithes**, avec un vitellus abondant, fusionné en une masse compacte, le noyau étant refoulé dans une aire cytoplasmique réduite : le disque embryonnaire (Oiseaux et Reptiles, nombreux Poissons, Mollusques Céphalopodes).
- Les œufs **centrolécithes**, propres aux Insectes, avec un vitellus central et un cytoplasme périphérique dépourvu de vitellus (cortex ou périplasma).

Les enclaves cytoplasmiques inertes, comme les constituants du vitellus, entraînent la cytodierèse. La segmentation est donc d'autant plus aisée que le cytoplasme en est moins encombré (règle de Balfour). La répartition de ces réserves va croissant suivant un gradient du pôle animal au pôle végétatif (sauf dans le cas des œufs centrolécithes). Les cellules de l'hémisphère animal se multiplient donc plus rapidement. Suivant que l'hémisphère végétatif pourra encore se diviser en cellules ou non, on distingue les œufs à **segmentation totale** (alécithes, oligolécithes et hétérolécithes), **segmentation partielle** (télolécithes, centrolécithes)¹.

5.1.2 Segmentation totale (ou holoblastique) (fig. 5.1)

Elle peut être **égale**, les blastomères résultants étant tous de même taille à la fin de la segmentation. Le cas est rare; elle existe pour des œufs **alécithes**, ex. : le synapte (Échinoderme Holothuride). Elle est le plus souvent **inégale**. Chez les Amphibiens, les blastomères de l'hémisphère végétatif ou **macromères** sont plus volumineux car plus chargés en vitellus ; ceux de l'hémisphère animal sont des **micromères**. Dans les premiers stades, l'ensemble des blastomères comprimés latéralement et gonflés sur la face libre évoquent une mûre, d'où le nom de **morula** donné à la jeune blastula. Les premières divisions cellulaires se déroulent suivant un ordre et avec un synchronisme rigoureux. Les deux premiers plans de segmentation passent par les pôles animal et végétatif, et sont perpendiculaires entre eux ; le troisième, horizontal, délimite les blastomères des hémisphères animal et végétatif. Suivant l'ordre dans lequel se disposent les blastomères fils résultant d'une division cellulaire antérieure, on distingue la segmentation de **type radiaire** et la segmentation de **type spiral**.

Chez les Mammifères, la segmentation totale est de **type rotationnel**. Le premier plan de segmentation est méridien, mais au cours du second cycle de division, les plans de segmentation des deux blastomères sont, l'un méridien et l'autre équatorial.

Au cours de la **segmentation radiaire** qu'on rencontre chez des Vertébrés et les Échinodermes, des sillons de segmentation méridiens et horizontaux alternent régulièrement lors des premières divisions. Les sillons méridiens déterminent des quartiers à l'intérieur desquels les plans de segmentation horizontaux entraînent une superposition des blastomères situés exactement les uns au-dessus des autres. La blastula présente une symétrie radiaire par rapport à l'axe de symétrie de l'œuf.

Au cours de la **segmentation spirale**, caractéristique notamment des Vers Annélides et des Mollusques autres que les Céphalopodes, dès la troisième division, les blastomères de l'hémisphère animal sont décalés latéralement par rapport à ceux de l'hémisphère



1. Le radical « lécithé » désigne le vitellus ; on dit aussi lécithique.

végétatif et se superposent à la jonction de deux blastomères végétatifs adjacents. Cette disposition résulte de l'orientation oblique des fuseaux mitotiques qui, observés depuis le pôle animal, forment une spirale qui s'enroule dans le sens des aiguilles d'une montre (spirale dextre) ou inverse (spirale senestre). Au cours des divisions ultérieures, la disposition alternée des blastomères se maintient, l'obliquité des fuseaux alternant vers la droite et la gauche.

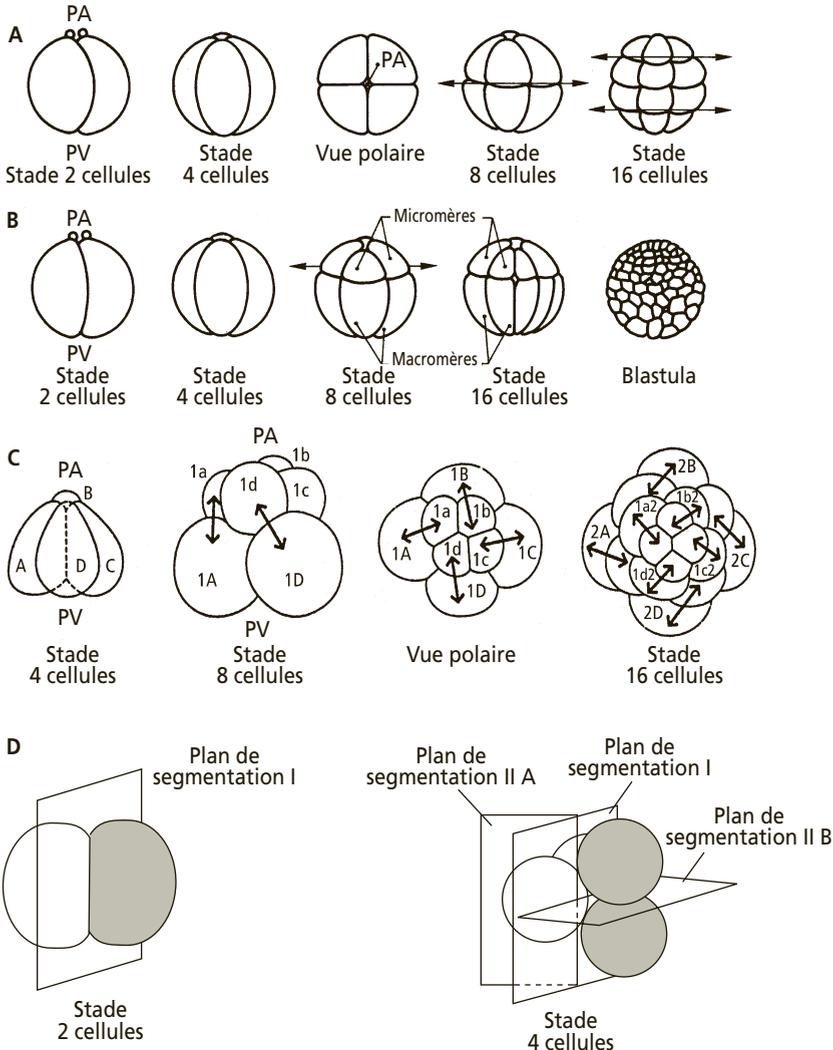


Figure 5.1 - Principaux types de segmentation totale.

A : Segmentation, radiaire, égale (ex : *g. Synapta*, Échinoderme Holothuride).
B : Segmentation, radiaire, inégale (ex : grenouille). **C** : Segmentation spirale. (Noter l'alternance de l'orientation des fuseaux à chaque division) (ex : *g. Spisula*, Mollusque Lamellibranche). **D** : Segmentation rotationnelle (Mammifères).

5.1.3 Segmentation partielle (ou méroblastique)

Chez les œufs très riches en réserves vitellines, la segmentation dans l'hémisphère végétatif est progressivement ralentie. Elle est totalement inhibée dans les œufs téléocéphales des Mollusques Céphalopodes, des Poissons osseux et Sélaciens, des Oiseaux et des Reptiles. La segmentation n'intéresse qu'un disque de cytoplasme dépourvu de réserves, contenant le noyau de fécondation et situé au niveau du pôle animal : c'est le disque germinatif désigné sous le terme de **blastoderme**. La segmentation est **discoïdale** et aboutit à une blastula, dite **discoblastula**, constituée d'un feuillet cellulaire séparé du vitellus par une cavité, le blastocèle (voir fig. 9.3).



Dans les œufs centrolécithes comme ceux des Insectes, le noyau de fécondation se trouve au centre de l'œuf au début de la segmentation. Il se divise un certain nombre de fois avant que les noyaux fils migrent, entourés d'une portion du cytoplasme central, vers le cytoplasme périphérique. Celui-ci est d'abord syncytial. Il s'organise en cellules par formation de membranes plasmiques, la masse vitelline centrale restant compacte. C'est une **segmentation superficielle** dite encore périphérique qui aboutit à une blastula dite **périblastula**. Il ne se forme pas de blastocèle (voir fig. 7.1).

5.2 GASTRULATION

Les divisions de segmentation se ralentissent, la croissance est nulle ou insignifiante. Des migrations coordonnées des cellules de certaines aires embryonnaires aboutissent à la mise en place des trois feuillets fondamentaux des Métazoaires dits **triploblastiques** : un feuillet externe, l'**ectoderme**, un feuillet profond, l'**endoderme** et un feuillet moyen, le **mésoderme**. Dans quelques embranchements primitifs il n'y a pas de mésoderme, mais seulement les deux autres feuillets ; c'est le cas des Métazoaires **diploblastiques** regroupant les Spongiaires et les Coelentérés.

Suivant les modalités des mouvements morphogénétiques, on peut définir plusieurs types de gastrulation.

- **La gastrulation par invagination (ou embolie) (fig. 6.1)**

Elle concerne des embryons possédant un blastocèle développé et des cellules endodermiques peu chargées en réserves vitellines, donc peu volumineuses (ex. : Oursins, amphioxus). Le feuillet constitué des cellules de l'hémisphère végétatif s'enfonce dans le blastocèle qui se réduit et tend à disparaître. Il délimite une seconde cavité emboîtée dans la première, l'**archentéron** ou intestin embryonnaire qui s'ouvre à l'extérieur par le **blastopore**. C'est la mise en place d'une ébauche de tube digestif qui a valu son nom au stade. En fin de gastrulation, c'est au niveau du blastopore que se fait la transition entre l'ectoderme et les feuillets invaginés, endoderme et mésoderme. L'endoderme limite l'archentéron, les éléments mésodermiques qui primitivement bordent également cette cavité migrent entre l'endoderme et l'ectoderme suivant des modalités qui varient avec les groupes zoologiques.

- **La gastrulation par épibolie**

Lorsque les blastomères végétatifs sont trop volumineux pour s'enfoncer à l'intérieur du blastocèle, ou lorsque le blastocèle est virtuel (c'est le cas de certains

vers Annélides comme les vers de terre), les cellules de l'hémisphère végétatif deviennent internes de façon passive, par multiplication et intercalation des cellules de l'hémisphère animal formant un feuillet qui les enveloppe progressivement. C'est le phénomène d'**épibolie**. Ce mécanisme peut se combiner au précédent quand la charge vitelline est de moyenne importance. C'est le cas chez les Amphibiens (fig. 8.4).

- *La gastrulation par immigration*

Elle se rencontre chez les Vertébrés amniotes. Chez les Oiseaux par exemple, des cellules migrent activement du blastodisque dans le blastocèle; elles y deviennent libres puis s'agencent pour constituer les feuillets internes, hypoblaste puis endoderme d'abord, mésoderme le long de la ligne primitive ensuite (fig. 9.6).

- *Les gastrulations par délamination et par prolifération polaire*

On les trouve par exemple chez les Cœlentérés. La première résulte de l'orientation des plans de divisions cellulaires qui, à un certain moment, s'orientent parallèlement à la surface de la blastula, d'où la formation d'un feuillet cellulaire interne endoblastique qui entoure un archentéron. La seconde se déroule par multiplication active des blastomères du pôle végétatif à l'intérieur du blastocèle. Un mouvement de délamination est également impliqué dans la formation finale du feuillet hypoblastique chez les Oiseaux.

5.3 ORGANOGÈNESE

Les mouvements morphogénétiques qui suivent la gastrulation mettent en place, selon le plan d'organisation de l'espèce, les ébauches d'organes qui se différencient. Chez les Vertébrés, la séparation du tube nerveux d'avec le reste de l'ectoderme est réalisée au cours de la **neurulation**. Chez les espèces aquatiques, aux œufs relativement pauvres en réserves (Échinodermes, Mollusques, Amphibiens) et chez les Insectes, le jeune éclôt sous la forme d'une larve différente de l'adulte. À la **métamorphose**, cette larve subit un ensemble de modifications importantes permettant son passage à l'état adulte. Ce type de développement est qualifié d'indirect.

Chez les espèces dont les œufs possèdent des réserves abondantes ou se développent dans l'organisme maternel, le développement est direct c'est-à-dire qu'il se poursuit jusqu'à la réalisation, dès la naissance, d'une organisation semblable à celle de l'état adulte. Cet état adulte sera atteint simplement par des processus de croissance.

Au cours du développement peuvent être mises en place des structures particulières, les **annexes embryonnaires**, facilitant le développement de l'embryon en lui assurant protection, mobilisation des réserves, stockage des déchets. Chez les espèces vivipares, ces annexes peuvent être utilisées pour établir des contacts avec la mère, le développement se déroulant dans les voies génitales maternelles.

Questions

- 5.1 Comment un œuf oligolécithe se définit-il ?
- 5.2 En quoi la présence de vitellus peut-elle jouer sur les modalités de segmentation ?
- 5.3 Citer des taxons chez lesquels on observe des cas de segmentation partielle ?
- 5.4 Chez quelles espèces observe-t-on une segmentation de type rotationnel ?
- 5.5 À quoi correspondent les termes blastodisque et blastoderme ?
- 5.6 Quelle est la signification biologique de la gastrulation ?
- 5.7 Quels sont les principaux types de gastrulation ?
- 5.8 Quels devenir observe-t-on à propos de l'orifice blastoporal ?
- 5.9 À partir de quel feuillet une cavité cœlomique se met-elle en place chez les Diploblastiques ?
- 5.10 Existe-t-il des annexes embryonnaires chez tous les Vertébrés ?

Réponses page 383

DÉVELOPPEMENT DE L'OURSIN

PLAN

- 6.1 Segmentation
- 6.2 Gastrulation

L'œuf d'Oursin est **oligolécithe**. Chez *Paracentrotus lividus*, la pigmentation corticale uniforme se rassemble après la fécondation en une ceinture pigmentée, dans l'hémisphère végétatif. Les deux globules polaires ont été émis avant la fécondation.

6.1 SEGMENTATION (fig 6.1)

La segmentation est totale radiaire et sub-égale, les différences de taille entre les blastomères n'étant jamais importantes. Les deux premiers plans sont méridiens, perpendiculaires et séparent quatre blastomères égaux. Le troisième plan équatorial sépare quatre blastomères animaux et quatre blastomères végétatifs contenant la ceinture pigmentée.

Au stade 16 cellules, les quatre blastomères animaux donnent 8 blastomères organisés suivant un plan radiaire (**mésomères**), tandis que les blastomères végétatifs se divisent suivant un plan sous-équatorial en 4 cellules contenant le matériel pigmentaire, les **macromères**, et 4 cellules plus petites au pôle végétatif, les **micromères**. Au cours des deux cycles de division ultérieurs les plans de segmentation vont diviser l'œuf de sorte qu'il comprendra cinq assises de blastomères. Les 8 blastomères animaux se divisent d'abord suivant un plan latitudinal, puis suivant un plan méridien, et forment deux couches de 16 blastomères (an. 1, an. 2). Les 4 macromères se divisent successivement suivant un plan méridien, puis latitudinal et forment deux couches de huit blastomères (vég. 1, vég. 2). Après 2 cycles de division, les 16 micromères formés restent au pôle végétatif en une seule assise. Les différences de taille s'estompent progressivement. À la fin de la segmentation, la blastula est creusée d'une cavité, le blastocèle, qui est apparu dès le stade 8. Les cellules embryonnaires s'organisent en une seule couche autour de cette cavité. Elles développent une ciliature avec une touffe apicale, ce qui permet, à l'éclosion, la libération d'une larve sous la forme d'une blastula libre nageuse. L'axe antéro-postérieur de l'œuf correspond à celui de la blastula et de la gastrula. Il reste stable au cours des expériences de régulation (voir § 12.3.1 et fig. 12.4).

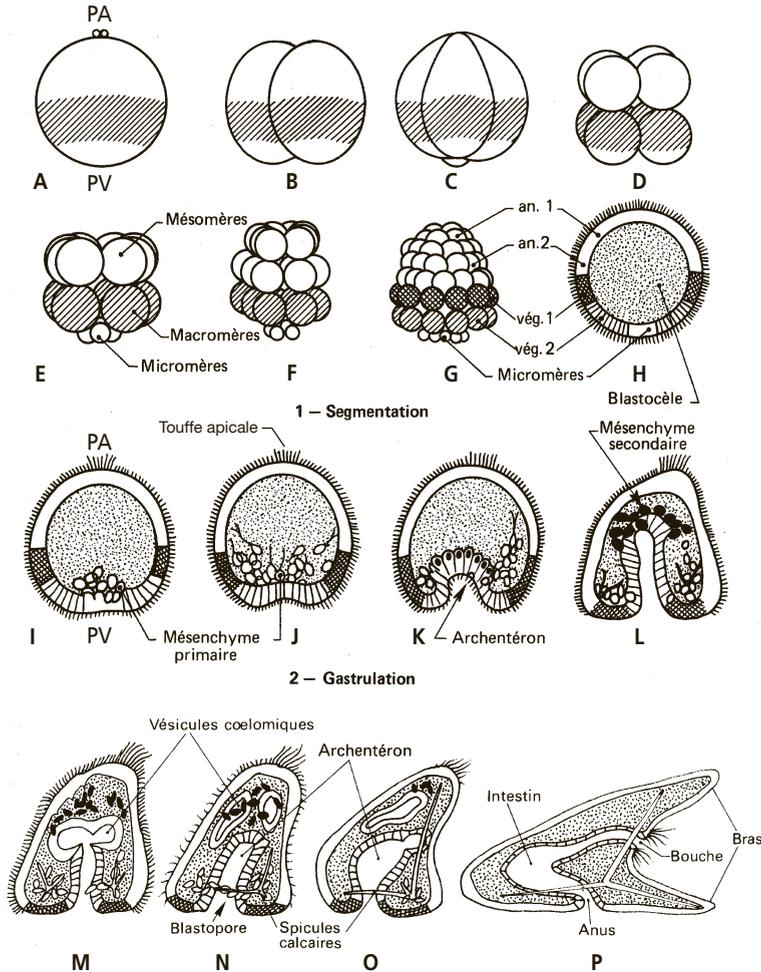


Figure 6.1 - Développement de l'oursin.

A : Œuf fécondé. **B, C, D** : Premières divisions de segmentations (2-4-8 blastomères)
E F G : Morula (16, 32, 64 blastomères). **H** : Coupe méridienne d'une blastula. **I** : Immigration des micromères qui forment le mésenchyme primaire (tissu mésodermique).
J, K : Invagination de l'endoderme, formation de l'archentéron. **L** : Formation d'un mésenchyme secondaire à partir du fond de l'archentéron par prolifération cellulaire.
M, N : Formation des vésicules coelomiques. **O, P** : Formation d'une larve pluteus : acquisition d'une symétrie bilatérale, ouverture d'une bouche et développement des bras.

6.2 GASTRULATION (fig 6.1)

En l'absence de réserves vitellines notables au pôle végétatif, la gastrulation se fait par embolie. La destinée de chaque catégorie de cellules de la morula est connue.

Dans un premier temps, des cellules dérivées des micromères, formant le **mésenchyme primaire**, migrent isolément dans le blastocèle. C'est la blastula avec mésenchyme. Ces cellules sécrètent les spicules calcaires de la larve **pluteus**.

Les territoires de l'endoderme et du mésoderme s'invaginent ensuite et forment l'**archentéron** qui s'ouvre par le **blastopore**. La limite d'invagination se situe entre les dérivés de la première et de la seconde rangée de macromères végétatifs. Tout l'hémisphère animal et la première rangée de macromères végétatifs forment l'ectoderme.

Tandis que la larve s'aplatit suivant la future région ventrale et acquiert une symétrie bilatérale avec un plan de symétrie passant par la bouche, l'anus et la touffe de cils apicaux, l'archentéron s'allonge. Des cellules se détachent de ce dernier et forment le **mésenchyme secondaire** à l'origine de catégories cellulaires diverses (cellules pigmentaires, cellules musculaires pharyngiennes...). Dans la partie terminale de l'archentéron, on observe des bourgeonnements qui donnent naissance à des vésicules à l'origine des formations coelomiques; celles-ci présenteront une évolution complexe. Ce mode de formation du coelome est désigné sous le terme d'**entérocoelie**. Lorsque l'individualisation des vésicules est achevée, l'extrémité de l'archentéron rencontre sur la face ventrale une dépression ectodermique où s'ouvrira la bouche, le blastopore devenant l'anus¹. La mise en place des trois feuilletts, ectoderme, mésoderme et endoderme est alors achevée. La larve s'étire, avec une face anale aplatie, une face orale dont la concavité s'accroît, cette face orale étant encadrée de quatre bras soutenus par les spicules calcaires. La larve pluteus est ainsi formée au bout de 3 jours (fig. 6.1). Elle possède une symétrie bilatérale à laquelle se substituera une symétrie radiaire d'ordre 5 au moment de la métamorphose.

Questions

- 6.1 À quel type d'œuf celui de l'oursin se rattache-il ?
- 6.2 Quel est le type de segmentation observé majoritairement chez les Echinodermes ?
- 6.3 Quel est le devenir des micromères ?
- 6.4 Quel est le nom donné à la larve caractéristique des Echinides ?
- 6.5 À partir de quelle région embryonnaire les vésicules coelomiques se mettent-elles en place ?
- 6.6 Quel nom donne-t-on à la manière dont se forme le coelome ?
- 6.7 À quel moment une symétrie d'ordre cinq se met-elle en place ?

Réponses page 384

1. Cela constitue la caractéristique des Métazoaires Deutérostomiens par opposition aux Protostomiens chez lesquels c'est l'orifice blastoporal, ou sa région, qui est à l'origine de la bouche.

7

DÉVELOPPEMENT D'UN INSECTE

PLAN

7.1 Segmentation et formation du blastoderme

7.2 Gastrulation et neurulation

Cette étude sommaire portera sur la segmentation et la gastrulation de l'embryon de drosophile (fig.7.1,7.2).

7.1 SEGMENTATION ET FORMATION DU BLASTODERME (fig 7.1)

La segmentation de l'œuf d'Insecte, **centrolécithe**, est une segmentation superficielle.

À la fin de la vitellogenèse, l'ovocyte est entouré de la **membrane vitelline** très fine, et d'une seconde enveloppe plus externe et plus dure, le **chorion**, sécrétée par les cellules folliculeuses et pourvue d'une ouverture apicale ou **micropyle**. L'emplacement de celui-ci marque la future région antérieure de l'embryon. C'est par cet orifice que pénètrent les spermatozoïdes contenus dans la spermathèque¹, lorsque l'ovocyte passe devant l'ouverture de celle-ci au moment de la ponte.

Après l'amphimixie, le noyau de fécondation situé dans la masse vitelline se divise rapidement et, 72 minutes après la ponte, l'embryon comprend la plupart des 128 **énergides** (c'est-à-dire des noyaux entourés d'un domaine cytoplasmique dépourvu de réserve et de membrane limitante). Après un cycle supplémentaire de division, les 256 énergides gagnent la périphérie de l'œuf. Les noyaux continuent à s'y multiplier, mais plus lentement. Il se forme un **blastoderme syncytial**. Au stade 512 noyaux, les **cellules polaires** s'individualisent dans la future région postérieure de l'embryon. Ces cellules ont un contenu cytoplasmique constitué par le **plasme polaire** (voir § 3.6.2) et sont à l'origine des **cellules germinales primordiales**. Les membranes plasmiques isolant les cellules du blastoderme se forment par invagination de la membrane de l'œuf ; chaque noyau entouré de son domaine cytoplasmique est isolé et, 3 heures plus tard, un **blastoderme cellulaire**, comprenant environ 6 000 cellules, est formé autour d'une masse centrale de vitellus contenant quelques noyaux vitellins, polypléides. Treize cycles cellulaires se sont succédés depuis la fécondation.

1. L'appareil génital femelle des Insectes comporte une poche, la spermathèque (fig 3. 13) où sont conservés les spermatozoïdes après l'accouplement, pendant des durées qui peuvent être assez longues.

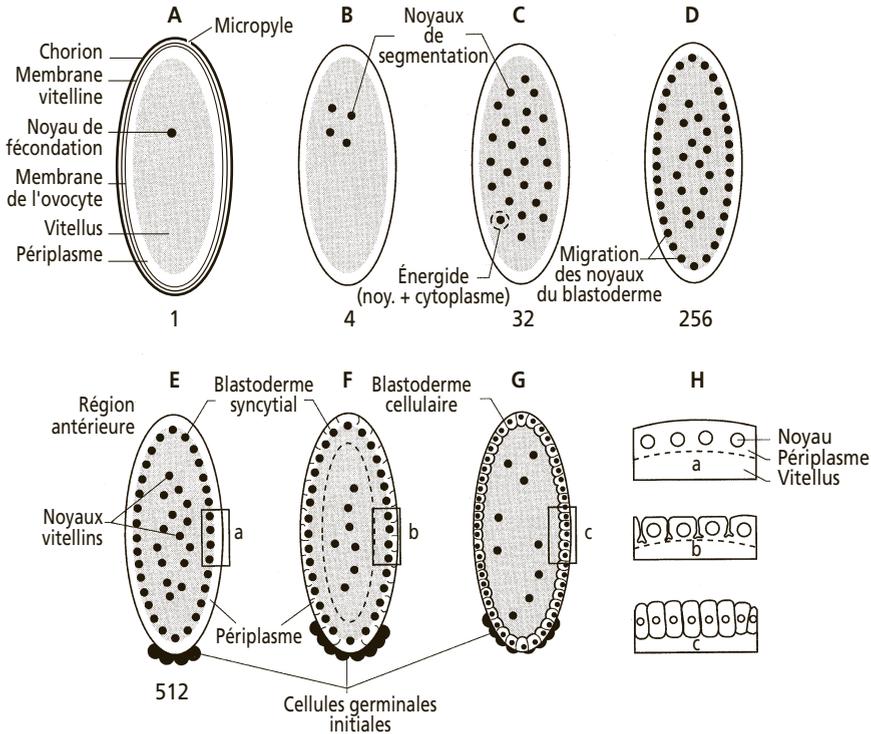


Figure 7.1 - Schémas de la segmentation de l'œuf de drosophile et formation du blastoderme.

A : Œuf fécondé. **B, C, D, E :** Multiplication des noyaux au sein d'un blastoderme syncytial (le nombre de noyaux est indiqué sous chaque figure). **C, D :** Les noyaux du blastoderme se mettent en place à la périphérie, dans le périplasma ; des noyaux vitellins restent dans l'aire vitelline centrale. **F, G :** Le blastoderme syncytial devient un blastoderme cellulaire. Les cellules germinales initiales sont individualisées au stade 512 noyaux. **H :** 3 phases de la cellularisation avec formation des membranes cellulaires par invagination de la membrane plasmique de l'œuf.

Dans le blastoderme syncytial, des différences apparaissent déjà parmi les noyaux quant à la durée de leurs cycles mitotiques et ceux-ci deviennent asynchrones tandis que la transcription d'ARN-m augmente. Cette augmentation s'accélère après le 14^e cycle cellulaire. C'est alors que les mouvements morphogénétiques de la gastrulation commencent.

7.2 GASTRULATION ET NEURULATION (fig 7.2)

À la fin de la segmentation, la carte des territoires embryonnaires présomptifs montre, en position ventrale, une large bande médiane correspondant au territoire mésodermique. Celui-ci est épais et constitué par environ 1 000 cellules, hautes et volumineuses. De part et d'autre de cette zone médio-ventrale s'étendent, latérale-

ment et dorso-latéralement, les territoires neurectodermiques. On trouve, en position antérieure et postérieure, des territoires ectodermiques et endodermiques qui participeront à la formation du futur tube digestif (fig. 7.2 A, B). L'ensemble de ces territoires organogènes du futur embryon constitue la **bandelette germinative** qui s'étend, chez la drosophile, sur toute la face ventrale du germe. Sur la face dorsale de l'embryon se situe la région de l'**amnio-séreuse**, d'origine ectodermique, qui ne participe pas directement à l'organogenèse.

Les cellules mésodermiques s'invaginent le long d'un sillon ventral qui se referme, et forment une ébauche aplatie de mésoderme sous l'ectoderme ventral (fig. 7.2 C, C').

Une double invagination du blastoderme, d'abord à l'arrière puis à l'avant du sillon ventral, met en place les territoires endodermiques antérieur et postérieur de l'intestin moyen qui se rejoignent sous la forme de deux bandelettes ventrales. Celles-ci fusionnent ventralement et, par expansion latéro-dorsale, englobent progressivement la masse vitelline (fig. 7.2 D-F'). Au cours du mouvement d'invagination de la partie postérieure du futur tube digestif, les cellules polaires sont entraînées à l'intérieur de l'embryon.

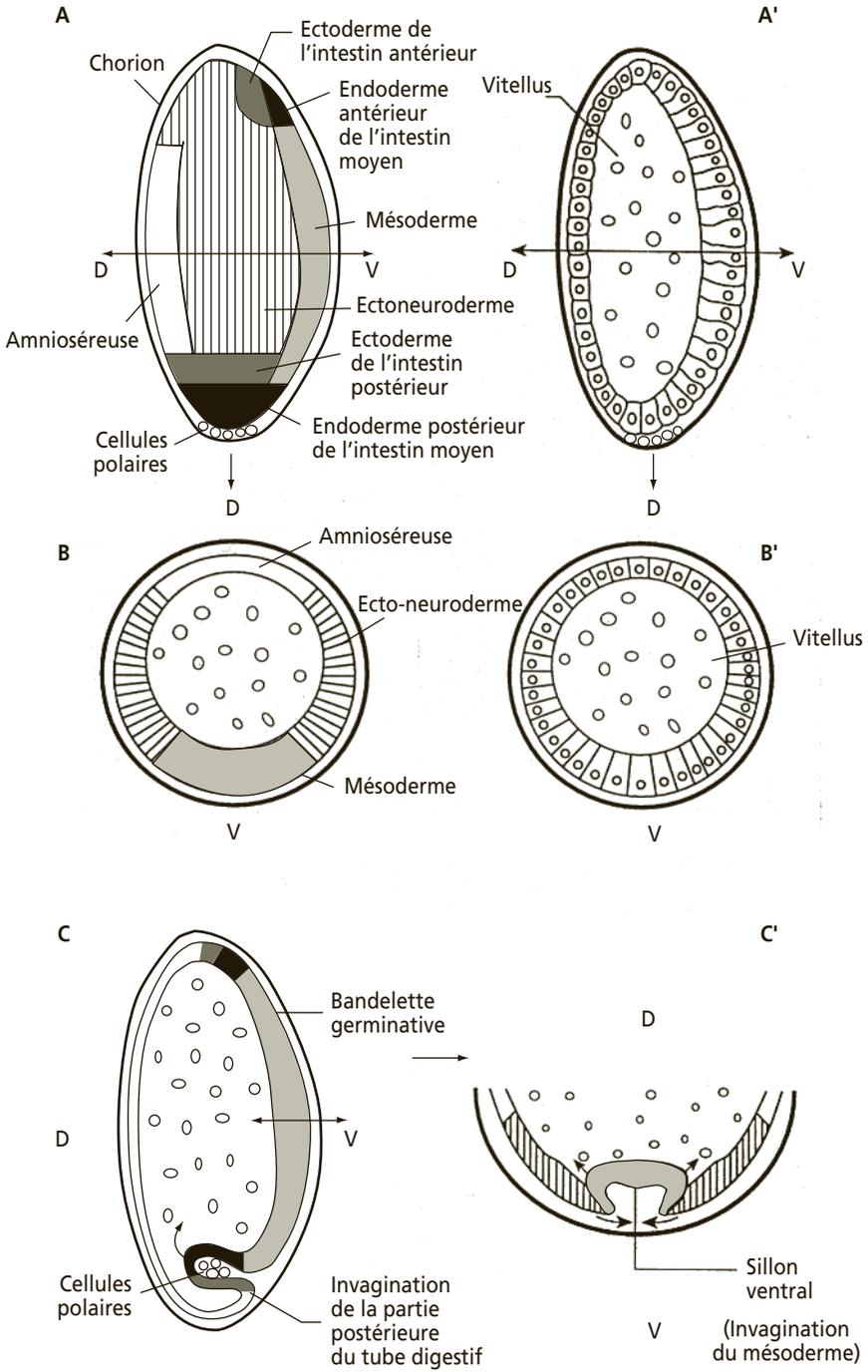
L'extension de la bandelette germinative dans sa partie postérieure retrousse cette dernière en position dorsale. L'extrémité de cette région qui correspond aux futures structures abdominale et caudale, se trouve ainsi repliée au-dessus de la future région céphalo-thoracique (fig. 7.2 F, G). Au cours de l'élongation dorsale de la bandelette germinative, la région de l'amnio-séreuse se trouve refoulée ; elle ne formera, chez la drosophile, qu'une structure de jonction constituée par une mince couche cellulaire aplatie¹.

Des cellules neuroblastiques se détachent du feuillet neurectodermique ventral et migrent pour former deux bandelettes longitudinales qui sont à l'origine de la chaîne nerveuse ventrale (fig. 7.2 E-F'). Par condensation, ces cellules forment une paire de ganglions par segment ; les ganglions de la région céphalique fusionnent ensuite en ganglions cérébroïdes.

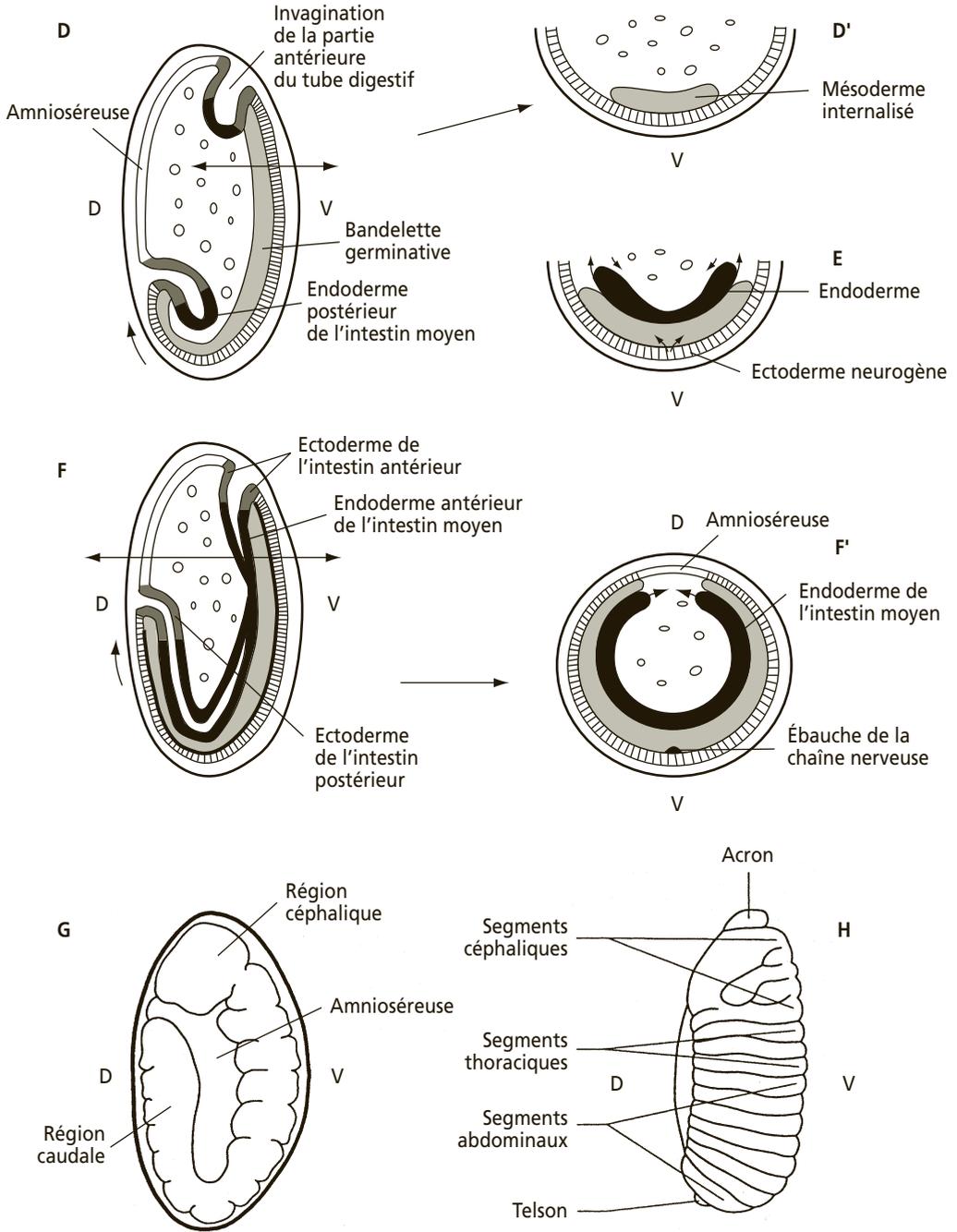
Figure 7.2 - Gastrulation et neurulation de l'embryon de drosophile (A-C).

A, B : Carte simplifiée des territoires présomptifs de la blastula en vue latérale externe (A) et en coupe transversale (B). **A', B'** : Coupes sagittale (A') et transversale (B) d'une blastula ; le blastoderme est épaissi dans sa partie ventrale. **C** : Coupe sagittale au début de la gastrulation ; invagination de la partie postérieure du tube digestif. **C'** : Détail d'une coupe transversale au même stade ; formation du sillon ventral par invagination de la bandelette mésodermique.

1. Chez les Insectes présentant une bandelette germinative de longueur réduite, l'amnio-séreuse forme des replis antéro-postérieur et latéraux qui fusionnent et sont à l'origine de structures membranaires extra-embryonnaires entraînant la formation d'une cavité amniotique ventrale dans laquelle baigne l'embryon.



Partie 2 • Embryologie descriptive



◀ **Figure 7.2 (suite)**

D : Formation de l'ébauche de la partie antérieure du tube digestif vue en coupe sagittale. **D'** : Coupe transversale au même stade montrant le mésoderme internalisé. **E** : À un stade ultérieur, deux bandelettes d'endoderme se développent et commencent à englober le vitellus. Immigration de cellules neuroblastiques à partir de l'ectoderme ventral. **F** : Extension en direction dorsale de la partie postérieure de la bandelette germinative. **F'** : Coupe transversale au même stade que F ; l'ébauche de la chaîne nerveuse ventrale s'est formée et la fermeture de l'intestin moyen est en cours d'achèvement. **G** : Vue externe d'un embryon de 5 heures. **H** : Vue externe d'un embryon de 10 heures, après rétraction de la partie retroussée postérieure de l'embryon.

L'embryon se contracte dans le sens antéro-postérieur, et le repli en position dorsale de la partie abdominale disparaît. La division du corps en segments ou **métamères** (voir § 8.6) devient visible. Sur une larve de 10 heures, se mettent en place 6/7 segments céphaliques (nombre soumis à controverse), 3 segments thoraciques et 8/9 segments abdominaux (nombre lié à un dimorphisme sexuel). Les régions apicales de l'animal, l'**acron** en avant du premier métamère et le **telson** en arrière du dernier ne sont pas des métamères.

On verra plus loin (voir chap. 11), que les mécanismes de régulation génétique qui déterminent la nature céphalique, thoracique ou abdominale d'un métamère chez un Insecte présentent de remarquables similitudes avec ceux qui contrôlent la différenciation des métamères suivant l'axe antéro-postérieur de tous les animaux métamérisés et notamment les Vertébrés.

Questions

- 7.1 À quel type d'œuf celui de la drosophile se rattache-il?
- 7.2 Quel est le type de segmentation observé chez les Insectes ?
- 7.3 Existe-t-il une polarité détectable chez l'œuf non fécondé de drosophile ?
- 7.4 Qu'appelle-t-on plume polaire ?
- 7.5 Qu'appelle-t-on énergide ?
- 7.6 À quoi correspond la bandelette germinative ?
- 7.7 Les extrémités antérieure et postérieure correspondent-elles à des métamères ?
- 7.8 À partir de quels feuilletts embryonnaires le tube digestif se constitue-il?
- 7.9 La drosophile est-elle un Hyponeurien ? Si oui, pour quelle raison ?
- 7.10 Combien de métamères observe-t-on pour chaque partie du corps de l'embryon ?

Réponses page 384

8

DÉVELOPPEMENT DES AMPHIBIENS

PLAN

- 8.1 Structure de l'œuf d'Amphibien
- 8.2 Segmentation
- 8.3 Gastrulation
- 8.4 Neurulation
- 8.5 Évolution des feuilletts après la neurulation
- 8.6 La métamérisation chez les Vertébrés

8.1 STRUCTURE DE L'ŒUF D'AMPHIBIEN (fig 8.1)

Le chapitre traitant de l'ovogenèse a exposé les mécanismes de la formation de cet œuf **hétérolécithe**¹. Cette structure conditionne les modalités de segmentation.

8.1.1 Œuf vierge

L'œuf vierge d'Amphibien Anoure ou Urodèle est une cellule arrondie de deux millimètres de diamètre. Il possède un axe de symétrie qui passe par le pôle animal (PA) sous lequel se trouve le noyau en métaphase de seconde division de méiose, au sommet de l'hémisphère animal, et par le pôle végétatif (PV), situé à l'opposé, au sommet de l'hémisphère végétatif.

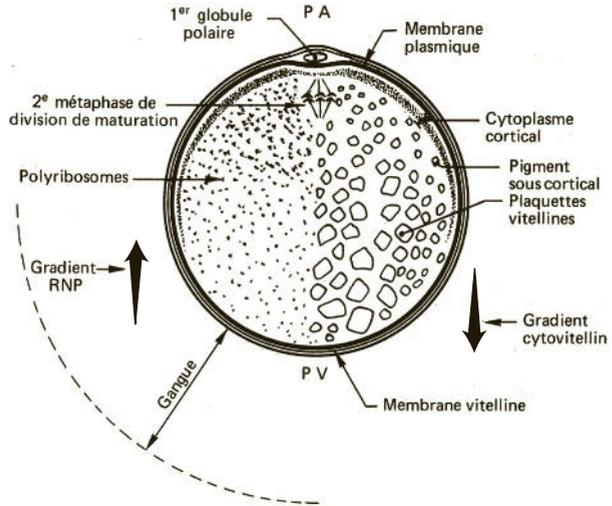
On distingue une couche de cytoplasme cortical superficiel et un cytoplasme interne.

Sous le **plasmalemme** (membrane plasmique) de l'œuf non fécondé, le **cytoplasme cortical** ne contient pas de plaquettes vitellines. Il est plus visqueux que le cytoplasme interne avec un cytosquelette constitué d'un réseau de microfilaments d'actine enserrant dans ses mailles des granules corticaux superficiels et des pigments (mélanine) en profondeur. Les granules corticaux sont d'origine golgienne ; ils sont absents chez les Amphibiens Urodèles. Les pigments sont répartis suivant une intensité qui diminue souvent chez certaines espèces, dans l'hémisphère végétatif. Ils sont également absents au voisinage du pôle animal de l'œuf vierge où le noyau est voisin de la membrane cellulaire ; c'est la **tache de maturation**, emplacement où les globules polaires sont expulsés au cours de la méiose, le premier lors de la maturation et le deuxième à la fécondation.

1. Cet embranchement contient aussi des espèces vivipares et des espèces à œufs télolécithes.

Figure 8.1 - Schéma d'un œuf vierge de grenouille.

Ce schéma met en évidence le pigment cortical présent surtout dans l'hémisphère animal, les gradients de concentration croissante des ribonucléoprotéines (RNP) en allant de PV vers PA, et du vitellus, suivant un gradient inverse de PA vers PV.



Le cytoplasme interne est hétérogène. C'est le résultat d'une répartition inégale des produits de synthèses élaborés pendant l'ovogenèse. Schématiquement, des ARN stables se répartissent suivant un gradient décroissant du pôle animal au pôle végétatif. À l'inverse, des réserves lipidiques, protéiques et glucidiques formant notamment des plaquettes vitellines suivent un gradient de taille croissante du pôle animal au pôle végétatif et de la périphérie de l'œuf vers le centre, de sorte que le hyaloplasme est peu abondant dans l'hémisphère végétatif. L'analyse globale montre que l'œuf d'Amphibien contient 52,5 % d'eau, 34,5 % de protéines, 7,5 % de graisses, 3 % de glucides et 2 % de substances diverses.

8.1.2 Modifications des structures cytoplasmiques à la fécondation

La pénétration du spermatozoïde dans l'hémisphère animal déclenche des remaniements cytoplasmiques dont la conséquence sera de déterminer le plan de symétrie de l'embryon dans les deux heures qui suivent la fécondation.

Le second globule polaire est émis après la pénétration du spermatozoïde, la tache de maturation disparaît par contraction du cytosquelette de la couche corticale pigmentée. Le noyau femelle haploïde ou pronucleus femelle se porte à la rencontre du noyau spermatique, pronucleus mâle, en une aire plus profonde du cytoplasme, le spermatozoïde entraîne du pigment dans le cytoplasme profond, formant la **traînée spermatique**.

8.1.3 Rétraction de l'œuf dans ses enveloppes : rotation d'orientation (ou d'équilibration)

Après la réaction corticale (voir § 4.3), le plasmalemmes est libéré du contact avec la membrane vitelline devenue la membrane de fécondation. L'œuf s'équilibre selon les lois de la pesanteur, le pôle végétatif plus lourd s'oriente vers le bas.

Cette **rotation d'orientation ou d'équilibration** s'achève en 30 minutes et intéresse la totalité de la masse de l'œuf (La chronologie qui est donnée correspond au développement à 18 °C d'un Urodèle).

8.1.4 Formation du croissant gris, acquisition du plan de symétrie de l'embryon : rotation de symétrisation (fig. 8.2)

Une heure dix après la fécondation¹, un déplacement de cytoplasme superficiel comprenant la couche pigmentaire s'effectue suivant un mouvement de bascule d'une ampleur d'environ 30 degrés, autour d'un axe passant par le centre de l'œuf, et orthogonal à un plan déterminé par l'axe PA-PV et la traînée spermatique. Le sens du déplacement est tel que le pigment descend vers le PV du côté correspondant au point de pénétration du spermatozoïde et remonte vers le P.A. du côté opposé. La zone de remontée a une forme de croissant de teinte grisâtre due à du pigment resté sur place, le **croissant gris** (ou **croissant dépigmenté**). C'est dans le plan défini par l'axe PA-PV et la traînée spermatique que la remontée du pigment est à son maximum. Ce plan constitue le plan de symétrie bilatérale de l'embryon et le croissant gris sa région dorsale. Le mouvement superficiel du cortex est appelé **rotation de symétrisation**.

Chez le xénope (fig. 8.2), ce mouvement est dirigé par le spermaster qui se développe, lors de la pénétration du spermatozoïde, dans le cytoplasme de l'hémisphère animal autour du centriole spermatique et qui suit la migration du pronucleus mâle. Après la fusion des pronuclei mâle et femelle au centre de l'hémisphère animal, le cortex dorsal se contracte en direction du point d'entrée du spermatozoïde, entraînant un retrait dans la partie dorsale. Le sens de ce mouvement du cortex dorsal est sans doute induit par les interactions entre les microfilaments du cortex dorsal et les microtubules mis en place sous le contrôle du spermaster. Ils sont orientés parallèlement à la direction de la rotation et ils disparaissent quand cette rotation est achevée. Des mouvements cytoplasmiques plus profonds sont liés à des déplacements le long de microtubules parallèles situés sous le cortex et associés au cytoplasme interne. Ils sont alignés dans la direction de rotation et se forment après que les mouvements de rotation corticale ont eu lieu. Ils n'interviennent donc pas dans la rotation du cortex, mais pourraient contribuer au mouvement d'organelles endogènes se déplaçant dorsalement suivant une ampleur de 60 à 90° à partir du pôle végétatif. Ainsi, Dishevelled, un composant de la voie Wnt, associé à de petites vésicules est déplacé vers le site dorsal prospectif pendant la réaction corticale (Miller et coll., 1999) (voir § 12.5.7). À ces mouvements correspond aussi dans le vitellus une dissymétrie avec remontée d'un **mur vitellin dorsal** (Ubbels et coll., 1983). C'est alors que les éléments du plasmé germinatif, qui ne sont plus ancrés aux plaquettes vitellines, se regroupent au pôle végétatif.

Chez les Urodèles qui sont polyspermiqes, on ne connaît pas de relation entre croissant gris et pénétration du spermatozoïde. Il est possible que, dans ce groupe, le plan de symétrisation soit prédéterminé.

1. Chronologie variable suivant les espèces. Il s'agit ici d'un Urodèle.

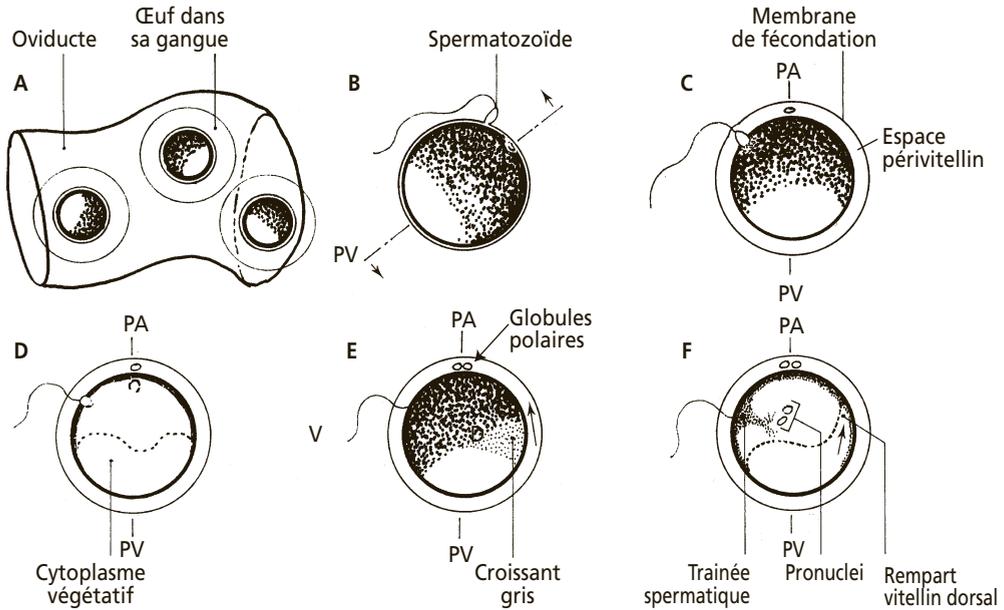


Figure 8.2 - Rotations d'orientation et de symétrisation dans l'œuf d'Amphibien.

A : Œufs vierges dans l'oviducte orientés de façon quelconque. **B et C :** Pénétration du spermatozoïde, décollement de la membrane de fécondation, rotation d'orientation. **D-F :** Rétraction superficielle du pigment vers le point de pénétration du spermatozoïde et formation du croissant gris dorsal. Remaniement profond du cytoplasme végétatif et formation du rempart vitellin dorsal. Œuf vu en coupe sagittale avant (4) et après (6) la rotation de symétrisation

8.2 SEGMENTATION (fig 8.3)

C'est une segmentation totale et inégale.

Le développement se déroule à l'intérieur de la membrane de fécondation, jusqu'à l'éclosion.

La durée de la segmentation varie avec les espèces. Chez l'axolotl, un Urodèle, le premier sillon de segmentation qui sépare les deux premiers blastomères apparaît 2 h 30 après la fécondation et coïncide dans 50 % des cas avec le plan de symétrie bilatérale de l'embryon. Après une seconde division suivant un plan méridien perpendiculaire au premier et une troisième sus-équatoriale, les blastomères commencent à s'écarter sur leur face interne pour délimiter un **blastocèle** qui occupera surtout l'intérieur de l'hémisphère animal. Les deux plans de division suivants sont méridiens et forment un angle de 45° avec les deux premiers. Les divisions sont d'abord synchrones pendant onze cycles, chaque cycle dépourvu des phases G1 et G2, dure 70 minutes. Ce rythme se ralentit et les divisions deviennent asynchrones, avec l'apparition de G1 et de G2, après le 11^e cycle qui correspond à la **transition**

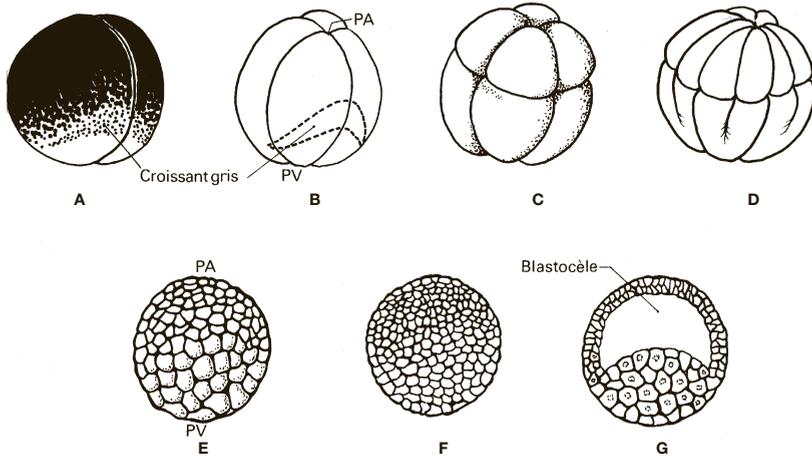


Figure 8.3 - Segmentation de l'œuf d'Amphibien représenté dépourvu de sa gangue.

A à D : Stades 2 à 16 ; **E :** Morula ; **F-G :** Blastula en vue externe et en coupe méridienne.

blastulienne ou **mi-blastula**¹. Le ralentissement est plus marqué dans l'hémisphère végétatif. Au bout de 30 heures à 18°C, l'embryon compte environ 10 000 cellules et la gastrulation commence.

La chronologie est différente chez le xénope, avec des cycles de 35 minutes et une mi-blastula atteinte à la 9^e heure de segmentation. Chez d'autres espèces aux œufs volumineux, certaines rainettes par exemple, elle est par contre beaucoup plus lente.

8.3 GASTRULATION (fig 8.4)

8.3.1 Manifestations externes de la gastrulation

Dans cet œuf hétérolécithe, la totalité des cellules contenant des inclusions vitellines est concernée par les mouvements morphogénétiques. La gastrulation dure 24 heures chez le pleurodèle ou l'axolotl, mais seulement 7 heures chez le xénope.

Une zone de dépression du matériel cellulaire, l'encoche du **blastopore**, se dessine sous l'emplacement du croissant gris dont les limites se sont estompées pendant la segmentation. Cette encoche se présente d'abord sous la forme d'un sillon horizontal incurvé, la lèvre dorsale du blastopore qui évolue progressivement tandis que les tissus mésodermique et endodermique pénètrent dans la cavité de segmentation et forment une seconde cavité qui s'y emboîte, l'**archentéron**. La lèvre blastoporale s'incurve, se prolonge par les **lèvres latérales**, puis se referme en un cercle avec l'apparition de la **lèvre ventrale** du blastopore, entourant le **bouchon vitellin** constitué par des cellules endodermiques encore visibles à l'extérieur et dont le diamètre se réduit progressivement. Le blastopore prend enfin la forme d'une

1. Ce qui correspond au début de l'activité de génome embryonnaire.

fente blastoporale verticale lorsque l'invagination est achevée. Cette fente, située au pôle végétatif par suite de la progression de la zone d'invagination dans l'hémisphère végétatif correspond à l'anus chez les Urodèles. Chez les Anoures, elle s'oblitére, l'anus résulte d'une réouverture secondaire.

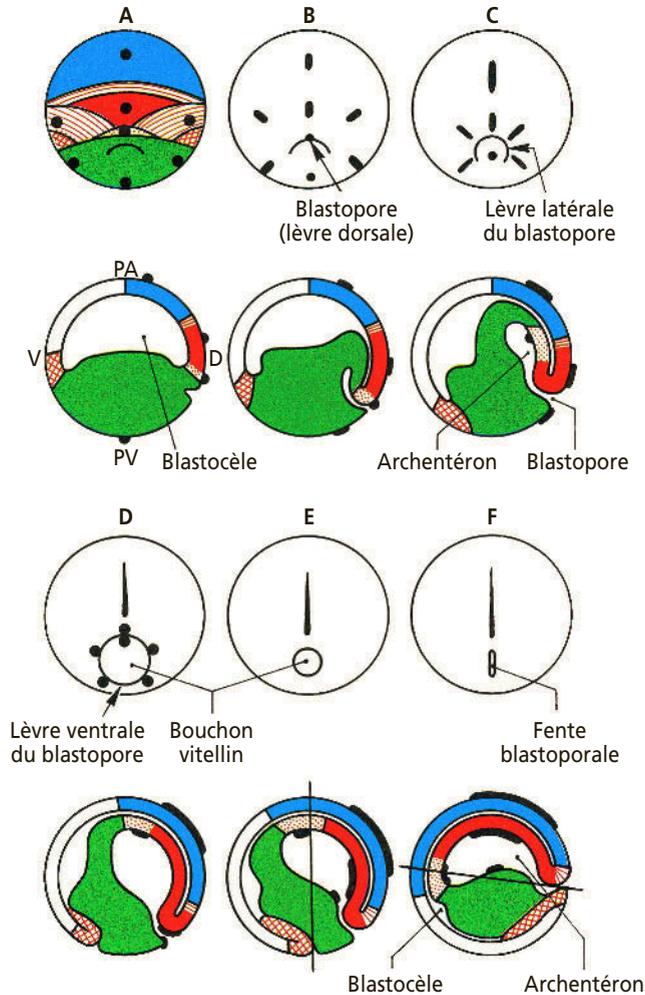


Figure 8.4 - Gastrulation d'embryon d'Amphibien Urodèle.

Vues externes dorsales : la lèvre blastoporale dorsale (A) se prolonge par des lèvres latérales (B, C) qui se rejoignent par une lèvre ventrale (D). Le tout circonscrit un bouchon vitellin qui se réduit (D, E) et fait place à une fente blastoporale (F) quand l'endoderme a disparu à l'intérieur. Les vues en coupe sagittale montrent la formation de l'archentéron, la réduction du blastocèle, l'élongation des feuilletts ectodermiques et mésodermiques. À la fin de la gastrulation, l'embryon bascule sur la face ventrale (F). Des marques colorées, représentées ici en noir, sont déposées à la surface de la blastula. On suit leurs déformations et leurs migrations jusqu'à la fin de la gastrulation. Les territoires sont représentés suivant des conventions précisées (fig. 8.5).

La formation et l'évolution du blastopore sont le résultat d'un mouvement combiné d'élongation et de recouvrement des tissus de l'hémisphère animal (épibolie) et de la disparition passive des cellules chargées en vitellus de l'hémisphère végétatif (embolie). Les mouvements de l'hémisphère végétatif provoquent une modification du centre de gravité, et un basculement de l'embryon sur la face ventrale. L'axe animal végétatif devient presque horizontal (fig. 8.4).

8.3.2 Carte des territoires présomptifs (fig. 8.5)

Il est possible par des techniques appropriées de marquage (voir encart 8.1) d'identifier dès la fin de la segmentation des ensembles cellulaires qui seront à l'origine des divers territoires embryonnaires. Cependant les **cartes dites des territoires présomptifs** ainsi établies ne permettent d'apprécier qu'une probabilité selon laquelle telle cellule issue d'une aire cytoplasmique donnée de l'œuf aura telle descendance, dans la mesure où il ne se produit pas de ségrégation rigoureuse entre les cellules issues des divers territoires cytoplasmiques de l'œuf.

Il faut noter que la carte classique des territoires qui est présentée ici est celle d'un Urodèle. Elle ne convient pas exactement au xénope chez qui les aires présomptives mésodermiques ne sont pas visibles en surface (voir *infra*).

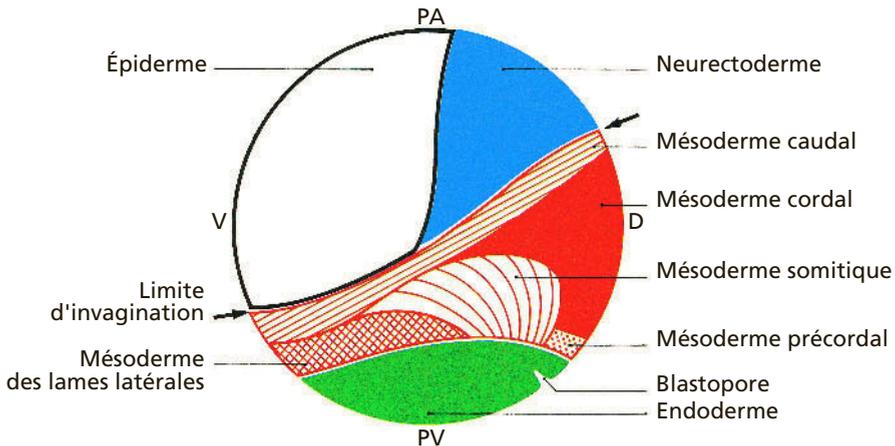


Figure 8.5 - Carte des territoires présomptifs d'une blastula d'Urodèle.
Vue latérale correspondant à la vue dorsale de la fig. 8.4 A.

Elle ne préjuge pas de l'état de détermination des territoires mais **n'indique que leur destinée probable**. On n'envisagera ici que les grandes subdivisions, bien que des localisations plus précises (organes des sens par exemple) soient connues :

- **L'ectoderme** correspond à peu près à l'hémisphère animal. Il se subdivise en une région ventrale, qui donnera l'épiderme et ses dérivés (placodes sensorielles notamment) et en une région dorsale, le neurectoderme, à l'origine du système nerveux.
- **Le mésoderme** forme une ceinture équatoriale et sous-équatoriale élargie dans la région dorsale. Cette ceinture est désignée sous le terme de **zone marginale**. On

identifie dorsalement les territoires de la corde et du mésoderme précordial à l'emplacement du croissant gris; latéralement, les territoires des somites et du mésoderme des lames latérales et une ceinture continue de mésoderme caudal.

- **L'endoderme** appartient à l'hémisphère végétatif. Il est à l'origine de l'épithélium du tube digestif et de ses dérivés. Il s'y forme les cellules germinales primordiales chez les Anoures.

ENCART 8.1

Etablissement d'une cartographie des territoires embryonnaires

Un marquage à l'aide de colorants vitaux des différentes parties de la surface de la blastula fut la première technique qui ait permis de suivre les mouvements cellulaires à la gastrulation et de reconstituer *a posteriori* une carte du devenir présomptif des différentes parties de la blastula avant la gastrulation : **la carte des territoires présomptifs**. Il suffisait d'utiliser de minuscules fragments d'agar agar imprégnés de rouge neutre ou de sulfate bleu de Nil qui étaient appliqués à la surface de la blastula immobilisée dans une logette de paraffine et convenablement orientée. On suivait ensuite le cheminement des marques colorées ainsi obtenues (fig. 8.4), ce qui permettait de préciser la chronologie, le sens et l'importance des mouvements des tissus pendant la gastrulation. D'autre part, on identifiait les différentes ébauches d'organes où se retrouvent les cellules colorées. Pour repérer sur la jeune blastula les emplacements normalement destinés à former un feuillet ou un organe donné, il suffisait d'y reporter après coup l'aire correspondant à ces organes et d'établir ainsi une carte des territoires présomptifs.

La carte des territoires ainsi dressée par Vogt (1925) reste très commode pour décrire les mouvements morphogénétiques. Cependant, on ne peut plus considérer qu'elle indique très exactement la destinée des cellules d'un territoire. En effet, ce marquage n'est pas assez précis; un certain degré de mélange cellulaire se produit à la frontière des territoires, dès la segmentation, puis à la gastrulation, ce que les marques colorées ne permettent pas de repérer. Par ailleurs, les plans de segmentation ne sont jamais exactement reproductibles.

On procède actuellement par microinjection dans un blastomère, d'une substance de poids moléculaire élevé qui ne peut traverser la membrane plasmique et par conséquent ne diffuse pas hors de la cellule. Il s'agit de molécules de dextrane liées à une molécule fluorescente, rhodamine ou fluorescéine qui, sous le microscope à ultra-violets apparaissent en rouge ou en vert dans les cellules dérivées du blastomère injecté. Ce type de marquage est, par exemple, pratiqué chez le xénope choisi pour la régularité de sa segmentation, sur une morula de 32 cellules. Il permet de localiser la position, dans la neurula, de chacune des cellules filles issues de chaque blastomère injecté et d'établir ainsi des filiations cellulaires (Dale et Slack, 1987). Il existe certes une relation avec la cartographie classique, mais on constate aussi qu'une fraction des cellules dérivées des blastomères bien identifiés s'est trouvée intégrée, au stade neurula, dans des ébauches d'organes que l'analyse classique ne prévoyait pas. Les frontières entre les différents territoires sont donc beaucoup moins précises qu'il n'apparaissait de prime abord avec la méthode de Vogt.

Il est à noter que chez les Urodèles, les cellules fondatrices du mésoderme se répartissent sur toute l'épaisseur de la paroi du germe au niveau de la zone marginale. Ce n'est pas le cas chez le xénope chez lequel les cellules mésodermiques sont situées au niveau de cette zone en profondeur, et seules les cellules ectodermiques et endodermiques constituent les couches superficielles de l'embryon.



La distinction parfois faite entre ectoblaste, mésoblaste et endoblaste d'une part et ectoderme, mésoderme et endoderme repose sur une conception actuellement dépassée de l'état de détermination et de la mise en place de ces feuillettes. Elle nous paraît difficile à maintenir actuellement et nous avons préféré uniformiser la terminologie.

8.3.3 Interprétation des mouvements morphogénétiques lors de la gastrulation (fig. 8.6)

Les tissus situés sous la limite de l'ectoderme vont passer à l'intérieur. Les mouvements sont complexes. On peut les décomposer comme suit :

- **Involution** correspondant à un enroulement des tissus mésodermiques de la zone marginale situés au-dessus de la lèvre dorsale du blastopore. C'est au cours de ce mouvement que les cellules acquièrent un pouvoir de migration, la migration active des cellules mésodermiques sur le toit du blastocèle s'avérant un phénomène clé de la gastrulation chez les Urodèles.
- **Convergence** des tissus mésodermiques axiaux, des somites et des lames latérales vers les lèvres blastoporales dorsale et latérales où ils involuent.
- **Extension et élongation** : L'extension de l'ectoderme lui permet de recouvrir activement la totalité de l'embryon par épibolie. L'extension et l'élongation du mésoderme se poursuivent encore à l'intérieur, après l'involution des tissus de l'hémisphère animal et la mise en place de l'axe antéro-postérieur.
- **Embolie (ou invagination)** de la masse de l'endoderme. Celle-ci est progressivement recouverte par les tissus ectodermiques, il n'en restera transitoirement qu'une petite partie visible entourée par les lèvres blastoporales, le bouchon vitellin.
- **Intercalation** : Des mouvements des feuillettes peuvent se produire grâce d'une part à l'augmentation de la population cellulaire et d'autre part à la réorganisation des relations cellulaires au sein d'un même feuillet par la voie des intercalations radiaires et des intercalations latérales.
- **L'intercalation radiaire** affecte notamment l'ectoderme de la calotte animale dont les cellules sont initialement organisées en couches pluristatifiées. Elle consiste en une imbrication sur un même plan de cellules appartenant à des couches différentes (fig. 8.7A). La surface finale de l'aire concernée en sera accrue, ce qui rend possible au cours de l'épibolie le recouvrement de l'embryon par l'ectoderme ainsi modifié. Le front de progression du feuillet ectodermique autour de la masse de l'endoderme devient visible à la fin de la gastrulation par la matérialisation de lèvres latérales et ventrales du blastopore.
- **L'intercalation latérale** concerne les cellules d'une même assise cellulaire qui se réorganisent de telle sorte que le feuillet s'allonge, sans changement de surface (fig. 8.7B). On l'observe dans les cellules mésodermiques ayant involué dorsale-

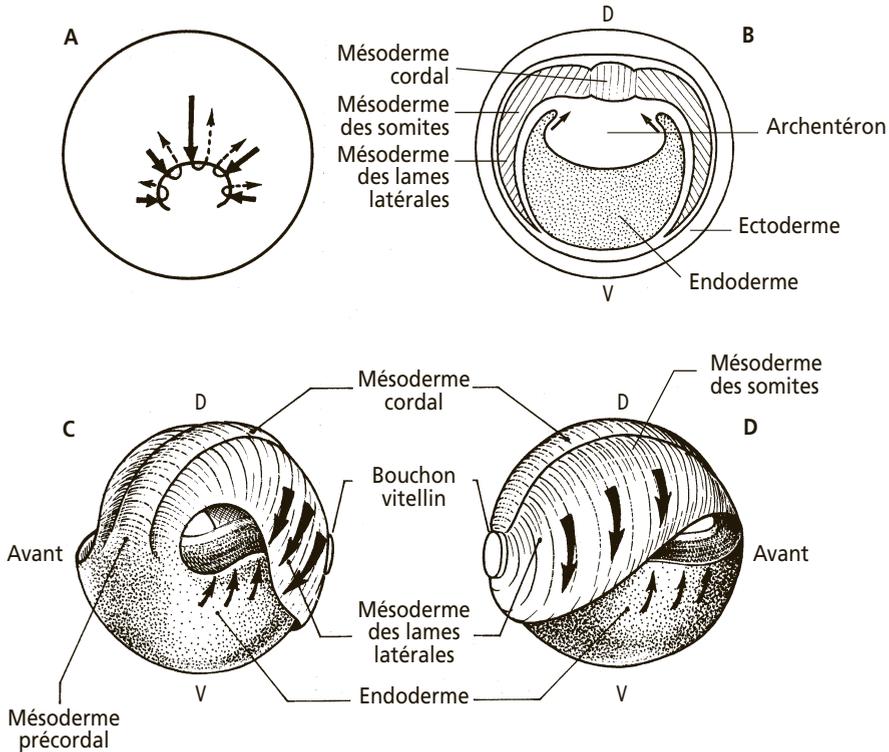


Figure 8.6 - Mouvements morphogénétiques lors de la gastrulation.

A : Vue dorso-végétative d'une gastrula avec indication des mouvements de convergence, élongation, enroulement autour des lèvres blastoporales, et divergence en profondeur. **B** : Coupe transversale de gastrula âgée lors de l'extension du mésoderme et de l'endoderme. **C** et **D** : Mouvements d'extension du mésoderme, de l'endoderme (flèches), l'ectoderme étant supposé enlevé. **C** : Vue de l'avant. **D** : Vue de l'arrière.

ment; elle aboutit à leur rassemblement selon une ligne médio-dorsale, ce qui provoque une élongation antéro-postérieure vers le pôle animal de l'ensemble cellulaire que ces cellules constituent. Ce phénomène est désigné sous le terme d'**extension convergente** et semble le processus majeur de la gastrulation chez les Anoures.

Les phénomènes d'intercalation jouent aussi un rôle à d'autres étapes de la morphogénèse, comme l'allongement de la corde, par exemple.

Le résultat de ces mouvements est la formation d'un germe à feuilletts emboîtés ; l'un, externe ou ectoderme, l'autre interne, composite avec une voûte dorsale mince de mésoderme et un plancher massif d'endoderme. Le feuillet interne limite une cavité nouvelle, l'archentéron, qui s'ouvre au niveau d'un blastopore qui peut se fermer pour s'ouvrir plus tard et former l'anus en une aire dépourvue de mésoderme. Le blastocèle est à peu près totalement oblitéré (fig. 8.4).

Simultanément, à la limite entre endoderme et mésoderme entourant l'archentéron, une discontinuité se crée. Il y a **divergence** du matériel mésodermique des

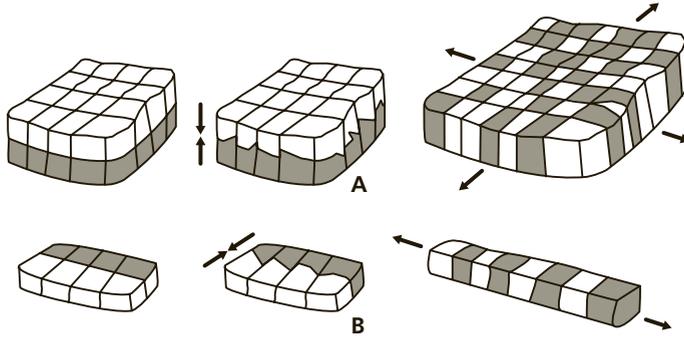


Figure 8.7 - Schémas des mécanismes d'intercalation radiaire et d'intercalation latérale.

A : Au cours de l'intercalation radiaire, les cellules appartenant à deux couches superposées s'imbriquent de sorte que la couche cellulaire finale, plus mince, sera plus étendue dans toutes les directions. **B** : Au cours de l'intercalation latérale, des cellules situées sur un même plan s'imbriquent de telle façon que le feuillet qui en résulte subit une extension dans une direction privilégiée.

lames latérales qui s'étale à droite et à gauche puis vers le bas entre l'ectoderme et l'endoderme. Les lames latérales se mettent en place plus précocement dans la région postérieure que dans la région antérieure. Parallèlement à ces mouvements du mésoderme, la masse endodermique se creuse et les parois latérales ainsi formées convergent et se rejoignent dorsalement, mouvements aboutissant à la formation du tube digestif et qui s'achèvent durant la neurulation. Trois feuillets emboîtés se mettent ainsi en place, l'ectoderme, qui s'épaissit sur la face dorsale, le mésoderme et l'endoderme. Dans le mésoderme, la couche axiale va s'isoler progressivement, le mésoderme précordial se dissocie sous l'ectoderme situé dans la future région céphalique (fig. 8.8).

8.4 NEURULATION (fig 8.8)

Cette étape du développement embryonnaire s'achève en 24 heures à 18 °C chez les Urodèles.

Extérieurement, on note un allongement dans le sens antéro-postérieur et un aplatissement de l'embryon dans la région dorsale, marquant l'apparition de la **plaque neurale** en forme de raquette. Celle-ci se creuse en gouttière neurale, se referme d'abord au niveau médian puis sur toute la largeur du germe, formant ainsi le tube nerveux. Des épaissements latéro-dorsaux répétés au niveau du tronc sont la manifestation de la différenciation des somites. Des épaissements antérieurs et latéraux dans la région du cerveau marquent les ébauches des placodes sensorielles (cristallin, oreille interne) et des bourgeons branchiaux.

Des mouvements internes internes se déroulent en continuation avec les mouvements gastruléens.

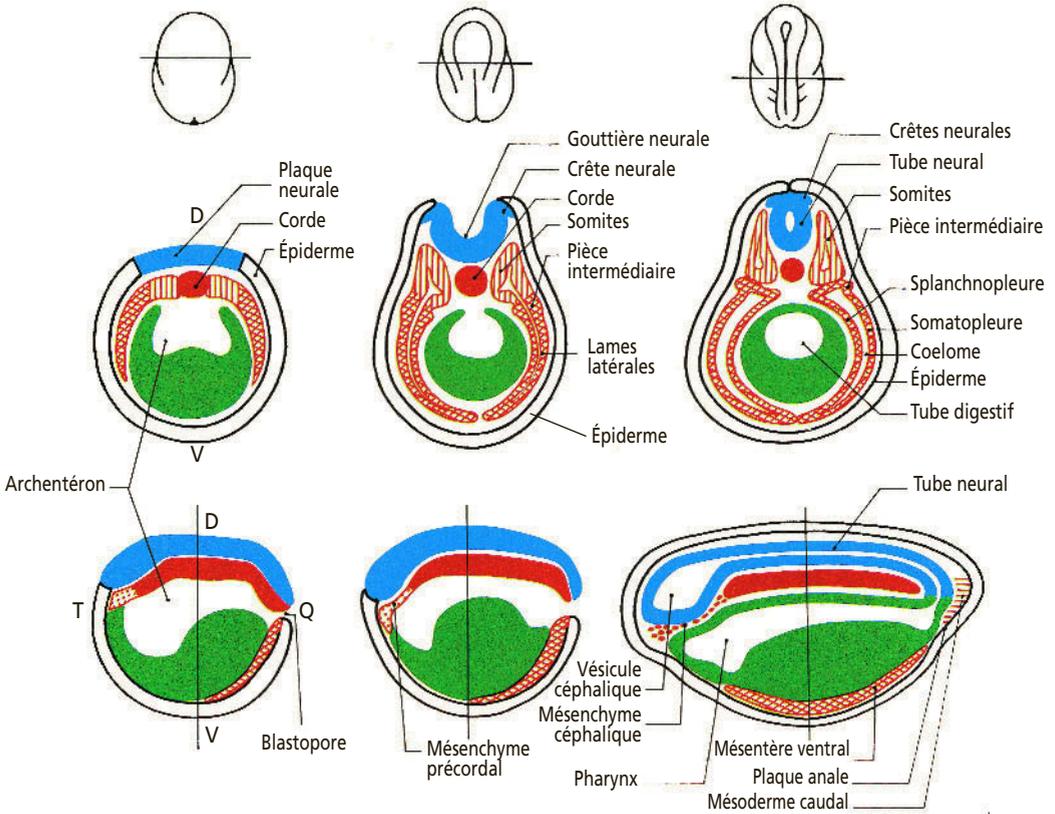


Figure 8.8 - Neurulation d'embryon d'Amphibien.

3 stades différents : Plaque neurale, gouttière neurale et tube neural. Haut : vues externes dorsales. Milieu : coupes transversales. Bas : coupes sagittales.

8.4.1 Différenciation du neurectoderme

L'ectoderme dorsal, en contact étroit avec le mésoderme, se différencie en neurectoderme sous l'influence inductrice de ce dernier (voir chap. 15). Les bords latéraux de l'aire aplatie de la plaque neurale forment les **bourrelets médullaires**. Leur partie la plus externe forme les **crêtes neurales**. La fusion des bourrelets dans le plan de symétrie de l'embryon isole un **tube nerveux** du restant de l'ectoderme. Celui-ci n'est plus alors constitué que par de l'épiderme qui recouvre la totalité de l'embryon et d'où s'isoleront plus tard des placodes sensorielles. Le tube nerveux est élargi vers l'avant en une **vésicule céphalique**, futur encéphale ; il est flanqué latéralement par les crêtes neurales.

8.4.2 Évolution du mésoderme et de l'endoderme

Dans le mésoderme, les **somites** s'individualisent, leur nombre varie suivant l'espèce. Ce sont des masses de mésoderme paires, situées de part et d'autre de la corde qui est axiale. Ils forment une structure répétitive qui se différencie en arrière du niveau de la

vésicule céphalique dans le sens antéro-postérieur. La **corde** s'isole en un cylindre de cellules turgescentes. Le **mésoderme précordial** s'étale sous la vésicule céphalique. Les **lames latérales** se creusent d'une cavité ou **coelome** qui est à l'origine de la cavité générale. Cette formation est dite par **schizocœlie**. Le feuillet externe est la **somatopleure**, le feuillet interne la **splanchnopleure**. Entre les lames latérales et les somites, des zones d'étranglement constituent les **pièces intermédiaires** qui s'isolent des somites mais restent en communication avec la cavité coelomique. Comme les somites, elles se métamérisent et forment le **gononéphrotome** à l'origine de l'appareil uro-génital.

L'endoderme achève son mouvement de fermeture dorsale permettant ainsi la formation du tube digestif. Ce feuillet se trouve au contact direct de l'ectoderme aux emplacements de la future bouche et du futur anus.

8.5 ÉVOLUTION DES FEUILLETS APRÈS LA NEURULATION (fig 8.9)

Le devenir de chacun de ces territoires est illustré par des schémas de bourgeon caudal en coupes transversale et sagittale.

Ces données s'appliquent à tous les Vertébrés; une partie des données exposées ci-dessous provient en réalité de travaux réalisés sur l'embryon de poulet.

8.5.1 Ectoderme

Il comporte plusieurs territoires, l'épidermique et le neurodermique comprenant le neurodermique et celui des crêtes neurales. Ce dernier sera étudié séparément compte tenu de la diversité et de l'importance de ses dérivés.

a) Territoire épidermique

Il se différencie en :

- **épiderme et phanères** : chez les Vertébrés supérieurs, les phanères se présentent sous la forme de structures variées : poils, plumes, écailles cornées, ongles et griffes, cornes ...
- **placodes sensorielles** : vésicules olfactives, cristallins, vésicules auditives.
- **placodes des lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse et certains ganglions crâniens.**

b) Territoire neurodermique

Il est à l'origine du système nerveux central avec :

- **la vésicule céphalique** : elle est formée d'abord de trois vésicules (le prosencéphale, le mésencéphale, le rhombencéphale). La première se divise en télencéphale (hémisphères cérébraux) et diencephale (avec les vésicules optiques), la deuxième donne les lobes optiques et les pédoncules cérébraux, et la dernière forme le métencéphale (cervelet) suivi du myélocéphale (bulbe rachidien)
- **le tube nerveux** : il évoluera en moelle épinière.

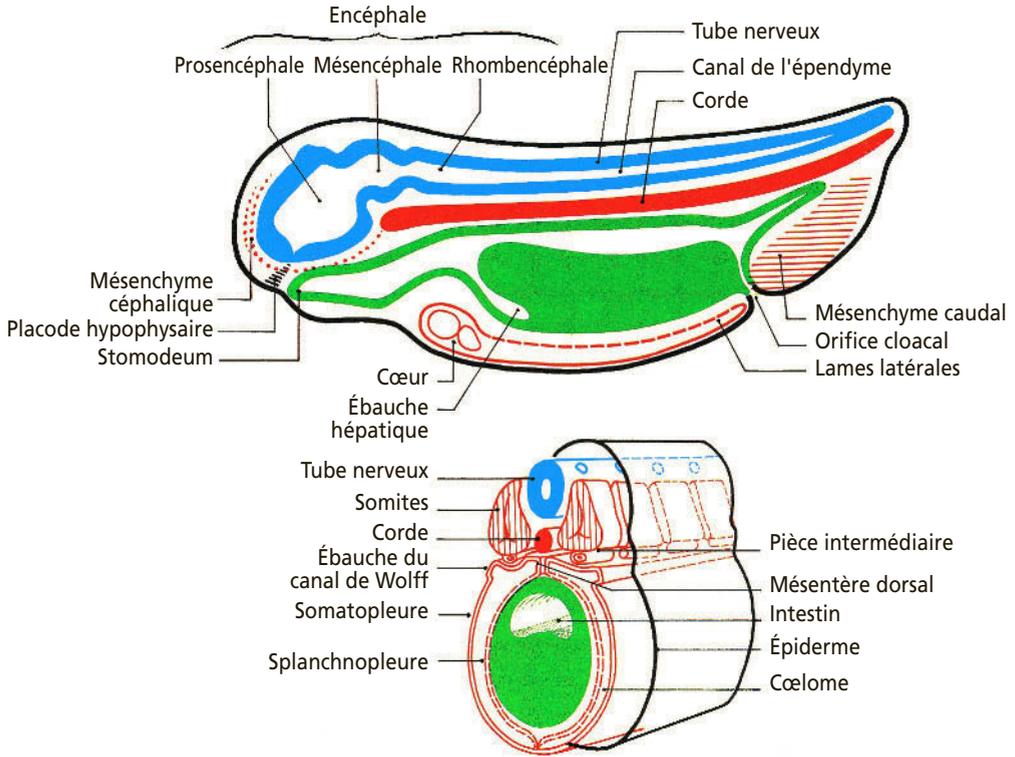


Figure 8.9 - Bourgeon caudal d'Urodèle en coupes sagittale et transversale avec une perspective montrant la métamérisation.

c) Les crêtes neurales

Leur rôle est essentiel dans le développement des Vertébrés et, d'après des spécialistes de l'évolution, c'est leur apparition qui a permis l'émergence de ce phylum à partir d'ancêtres du Précambrien.

Le territoire des crêtes neurales se situe à la limite de l'épiderme et de la plaque neurale. Il est constitué de cellules pluripotentes qui se caractérisent par leur pouvoir migratoire, leur capacité de prolifération élevée, l'importance et la diversité de leurs dérivés. Ces cellules évoluent différemment suivant qu'elles appartiennent à la région de la tête ou du tronc :

- Elles fournissent au niveau de la tête les ganglions crâniens, les méninges et leur vascularisation, la paroi des gros vaisseaux artériels issus du cœur, des éléments du squelette à savoir la totalité des os de la face et des éléments dérivés des arcs branchiaux (mandibule, os hyoïde, osselets de l'oreille moyenne), les dents, les os du crâne à l'exception de quelques éléments du plancher de la boîte crânienne. En proviennent également le derme de la face et du cou, certains muscles lisses et striés, les tissus conjonctifs de ces muscles ainsi que des glandes situées dans la tête et le cou (glandes salivaires, glandes lacrymales, hypophyse, parathyroïde, thyroïde, thymus).

- Les crêtes neurales du tronc migrent en deux vagues et constituent le système nerveux périphérique (ganglions rachidiens, chaînes ganglionnaires sympathiques et parasymphatiques, plexus nerveux du tube digestif, cellules de Schwann des nerfs périphériques), les cellules chromaffines des glandes médullo-surrénales, les cellules à calcitonine de la thyroïde des Mammifères.

Enfin, sur toute la surface du corps, elles sont à l'origine des cellules pigmentaires (dont les mélanocytes), responsables notamment de la coloration de tous les phanères, poils, plumes, écailles; la rétine pigmentaire en est exceptée.

8.5.2 Mésoderme

Il se subdivise en quatre territoires.

a) Mésoderme cordal et précordal (mésoderme axial)

Chez la quasi-totalité des Amphibiens, la corde régresse et disparaît à l'état adulte¹. Le mésoderme précordal forme le mésenchyme céphalique d'où dérivent divers constituants de la tête et notamment une partie du squelette de la tête.

b) Mésoderme des somites (mésoderme para-axial)

Il comprend deux régions : le **sclérotome** et le **dermomyotome**. La première est à l'origine des ébauches du squelette axial (corps vertébraux). La seconde est fugace et donne rapidement le **dermatome** formant le tissu mésenchymateux du derme dorsal, et le **myotome** à l'origine de toute la musculature squelettique striée à l'exception de certains muscles de la face.

c) Mésoderme des pièces intermédiaires

Restant provisoirement en communication avec le cœlome des lames latérales situées du même côté, les pièces intermédiaires forment les blastèmes rénaux, la médulla des gonades et les conduits urinaires (voir § 17.1.5 et 17.2.1).

d) Mésoderme des lames latérales

Il est constitué de façon symétrique par deux feuillets séparés par la cavité cœlomique et qui, en s'accolant ventralement puis dorsalement, forment les mésentères ventraux et dorsaux.

- **La *splanchnopleure*** (ou feuillet interne) est à l'origine du myocarde et de l'endocarde, des muscles lisses du tube digestif, de l'endothélium des vaisseaux sanguins, des cellules sanguines.

- **La *somatopleure*** (feuillet externe) donne la musculature viscérale de la tête, le péricarde, les structures conjonctives et squelettiques des membres, le cortex des gonades.

1. Elle peut subsister sous une forme intervertébrale réduite chez quelques rares espèces d'Amphibiens et quelques Poissons. Il est à noter que la corde ne persiste à l'état adulte que chez les vertébrés primitifs tels les myxine et lamproie, le coelacanthé ou l'esturgeon.

8.5.3 Endoderme

Ce feuillet constitue :

- les épithéliums du tube digestif (cellules sécrétrices et cellules de soutien) et des glandes annexes (glandes salivaires, hépatocytes du foie, pancréas), des glandes de la cavité pharyngienne et de ses dérivés (thyroïde, parathyroïde, thymus),
- les épithéliums du poumon et de la vessie.

8.6 LA MÉTAMÉRISATION CHEZ LES VERTÉBRÉS

Un **métamère** est une unité d'organisation du corps qui se répète presque à l'identique, délimitant des segments le long de l'axe antéro-postérieur.

Chez certains Invertébrés, (exemple : segments de Vers Annélides), ce mode d'organisation répétitif est assez bien conservé. Cependant, au cours de l'évolution, des spécialisations de plus en plus poussées des différentes régions du corps ont pu aboutir, dans certains taxons, à ce que l'organisation en segments ne soit plus visible chez l'adulte et ne reste perceptible que chez l'embryon. Il n'en demeure pas moins que de nombreux caractères de la métamérie subsistent chez l'adulte. C'est le cas des Vertébrés.

La segmentation du mésoderme para-axial en somites est une manifestation de cette organisation qui reste partiellement visible chez le Vertébré adulte. Le mécanisme de la somitogenèse est étudié plus loin (voir chap. 15.6).

- Les vertèbres, par exemple, sont des structures métamérisées, formées par l'union d'éléments provenant de la moitié antérieure d'un somite et de la moitié postérieure de celui qui le précède.
- La division en somites du mésoderme dorso-latéral influence la disposition d'autres organes, notamment la distribution des nerfs moteurs, des ganglions spinaux et sympathiques. La répartition de ceux-ci est imposée par le découpage du mésoderme dorso-latéral en sclérotomes, une paire de ganglions se situant entre deux sclérotomes successifs.
- Le mésoderme dorsal n'est pas seul à être métamérisé ; le rhombencéphale de la jeune neurula est segmenté en sept rhombomères et cette organisation conditionne celle, ultérieure, des nerfs crâniens, du mésoderme pharyngien (arcs viscéraux), ainsi que la destinée des cellules des crêtes neurales, qui semble dépendre de leur rhombomère d'origine (voir § 11.3.2 et fig. 11.7).

Nous verrons que chaque métamère se différencie en fonction du niveau où il se trouve le long de l'axe antéro-postérieur du corps, et que cette différenciation est régulée par des familles de gènes régulateurs, dont les mieux connus actuellement sont les gènes sélecteurs homéotiques (voir § 11.2.4).

Questions

- 8.1 À quel type d'œuf celui d'un Amphibien se rattache-il ?
- 8.2 Par suite de quel phénomène la rotation d'équilibration se produit-elle ?
- 8.3 À partir de quel moment le plan de symétrie bilatérale se trouve-t-il mis en place ?
- 8.4 Au bout de combien d'heures après la fécondation observe-t-on le stade neurula ?
- 8.5 Quels sont les mouvements morphogénétiques qui affectent les territoires à destinée mésodermique ?
- 8.6 Dans quels territoires cellulaires observe-t-on des mouvements d'intercalation ?
- 8.7 Que désigne-t-on sous le terme de mésoderme para-axial ?
- 8.8 Quels noms donne-t-on aux diverses vésicules céphaliques quand elles sont au nombre de trois puis de cinq ?
- 8.9 Quels sont les tissus qui ont pour origine les cellules des crêtes neurales ?

Réponses page 385

DÉVELOPPEMENT DES OISEAUX

9

PLAN

- 9.1 Structure de l'œuf d'oiseau
- 9.2 Segmentation
- 9.3 Gastrulation
- 9.4 Neurulation
- 9.5 Annexes embryonnaires

9.1 STRUCTURE DE L'ŒUF D'OISEAU

9.1.1 Organisation de l'œuf et de ses enveloppes (fig. 9.1)

C'est un œuf **télolécithe** qui se caractérise par une accumulation tardive de réserves. La croissance de l'ovocyte se déroule lentement jusqu'à une semaine environ avant l'ovulation; dans une seconde phase qui dure 6 à 7 jours chez la poule, l'œuf passe de 0,2 à 16 grammes environ. Il se dépose un **vitellus** dont les éléments sont élaborés dans le foie. Le jour, un vitellus jaune se forme, plus riche en graisse et en pigment que le vitellus nocturne qui est blanc. La **latebra** est la masse centrale du vitellus anciennement formé, le **col** et le **noyau de Pander** marquent le chemin de migration de la **cicatricule** encore appelée **disque germinatif** vers la surface du cytoplasme pendant la croissance de l'œuf. La cicatricule, de 3 mm de diamètre, marque le pôle animal de l'œuf ; constituée de cytoplasme sans réserves dans lequel se trouve le noyau, elle seule se segmentera.

Une **membrane vitelline** constituant une membrane primaire entoure primitivement l'ovule. Puis, qu'il y ait eu fécondation ou non, celle-ci se produisant quand elle a lieu au niveau de la trompe de l'oviducte, des enveloppes dites secondaires vont se déposer lors du transit de l'œuf dans le tractus génital. Le blanc ou **albumine** se forme en trois heures dans une portion égale à la moitié de la longueur de l'oviducte (le magnum), puis la membrane coquillière se dépose dans l'isthme en une heure. Le blanc s'enrichit en eau dans l'utérus où son volume double ; la coquille se constitue en 22 heures.

L'œuf d'Oiseau est composé d'eau, 65 %; de protéines, 12 %; de graisses, 10 %; de calcite, 10 % et divers, 2,5 %.

9.1.2 Acquisition de l'orientation de l'embryon

L'axe antéro-postérieur de l'embryon se fixe au cours du séjour de l'œuf dans l'utérus (fig. 9.2) après formation des membranes et de la coquille. Les enveloppes de l'œuf subissent un mouvement de rotation qui se matérialise par la torsion d'une

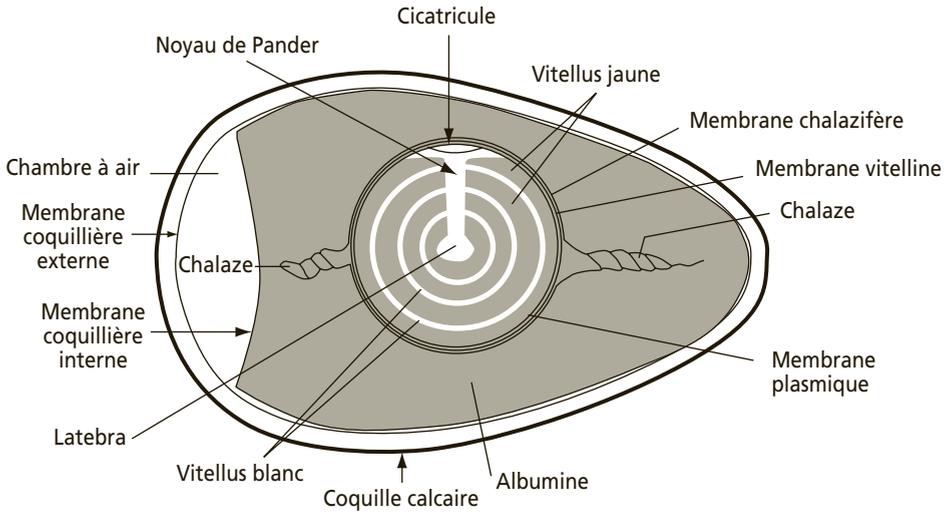


Figure 9.1 – Représentation schématique d'un œuf de poule (d'après Renoux, 1971).

partie de l'enveloppe albumineuse, les **chalazes**, qui se fixent à la membrane coquillière : à la droite de l'embryon, la chalaze est senestre, à sa gauche elle est dextre. C'est la pesanteur et le sens de rotation de l'œuf durant son transit dans le tractus génital qui interviennent dans cette détermination.



La démonstration en a été apportée en agissant sur des œufs obtenus précocement par pression au niveau de l'utérus où ils n'avaient séjourné que 10 heures. L'axe antéro-postérieur n'est pas encore définitivement fixé et sa direction peut être modifiée selon la position qu'on fait adopter expérimentalement aux œufs en les tournant artificiellement.

Dans les conditions normales, le disque germinatif, ou blastodisque adopte une position dans l'espace telle que l'axe de l'embryon est perpendiculaire au grand axe de la coquille, la tête étant tournée dans le sens de la rotation de l'œuf. L'acquisition

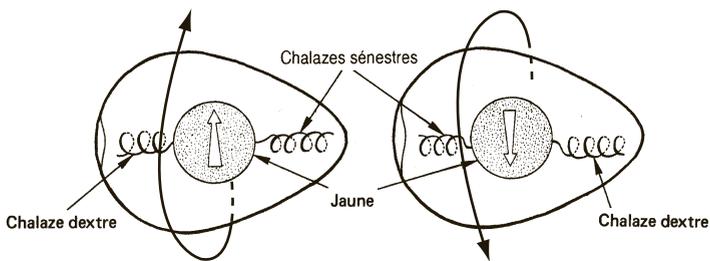


Figure 9.2 – Détermination de la polarité céphalo-caudale chez l'embryon d'Oiseau (d'après Clavert, 1960).

Dans un œuf d'Oiseau, l'enroulement des chalazes par rapport à l'embryon examiné la tête vers l'avant, est dextre sur la gauche de l'embryon et senestre sur sa droite. Cette orientation est déterminée essentiellement par le sens de rotation des enveloppes dans l'utérus, indépendamment de l'orientation du gros bout et du petit bout de la coquille.

de la symétrie bilatérale n'est irréversible qu'après un temps de transit dans l'oviducte de 14 à 16 heures ; ce temps correspond à un stade de la segmentation où les cellules de la zone marginale postérieure, qui ont des capacités organisatrices identiques à celles du centre de Nieuwkoop chez les Amphibiens (voir § 12.5.3 et 12.5.4), sont en place (Khaner, 1995). Le plan dorso-ventral de l'animal correspond au gradient vitellin, la partie dorsale étant à la surface du disque germinatif.

9.2 SEGMENTATION (fig 9.3)

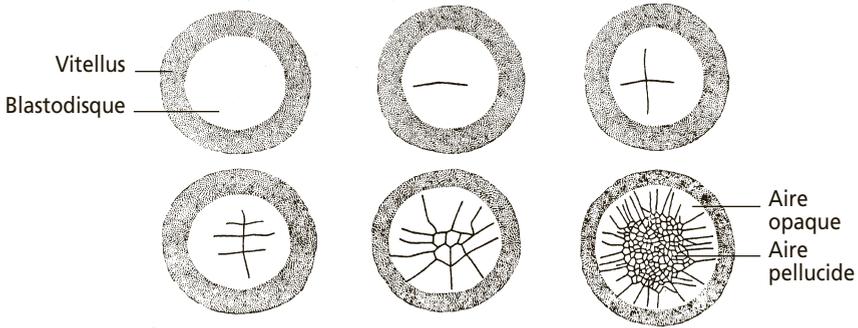
C'est une segmentation partielle qui n'intéresse que le disque germinatif (segmentation discoïdale). Son cytoplasme est dépourvu de réserves et contient le noyau de fécondation. Chez le poulet, la segmentation se produit dans l'oviducte et commence 5 heures après la fécondation pour s'achever au bout de 24 heures. La blastula comporte alors quelques dizaines de milliers de cellules.

Les premiers blastomères, jusqu'au stade 16 cellules, n'ont pas de membrane plasmique inférieure (fig. 9.3A). Le blastodisque en segmentation ou **blastoderme** compte 8 blastomères centraux à limites nettes et 8 blastomères périphériques dont les limites avec le vitellus sont peu distinctes. Aux stades 32 et 64, les blastomères centraux acquièrent une limite inférieure. Plusieurs assises cellulaires se mettent en place par multiplication des cellules du disque central. Une cavité se creuse entre celles-ci et le vitellus sous-jacent formant le **blastocèle primaire** (fig. 9.3B). On distingue alors plusieurs régions dans le blastoderme. Au centre, l'**aire pellucide** avec les cellules au-dessus de la cavité de segmentation. À la périphérie, l'**aire opaque** comprend 3 zones : la **zone de recouvrement**, où les mitoses sont actives, avec des blastomères bien individualisés au contact du vitellus, le **rempart germinatif** qui est une zone profonde dont les blastomères sont individualisés, la **zone de jonction** qui est une assise profonde, sans limites nettes avec le vitellus et qui constitue le syncytium vitellin.

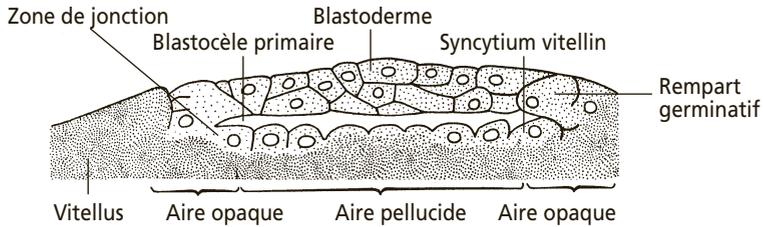
9.3 GASTRULATION

Différentes méthodes ont été utilisées pour établir des cartes des territoires présomptifs de la blastula des Oiseaux et analyser les mouvements morphogénétiques. On emploie surtout actuellement la technique des greffes caille-poulet mise au point par N. Le Douarin dès 1968 qui utilise deux espèces très proches appartenant à la famille des Gallinacées et qui se développent au même rythme. On excise, sous la loupe bino-culaire, un territoire chez l'embryon d'une des espèces considéré comme receveur et on le remplace par le territoire analogue prélevé chez l'embryon de l'espèce donneuse. Les cellules issues du greffon et de l'animal greffé restent parfaitement identifiables pendant tout le développement, grâce à une différence dans la structure de leur noyau ; chez la caille, une masse volumineuse d'hétérochromatine est accolée au nucléole, alors que la chromatine de l'embryon de poulet est diffuse. Ce marqueur nucléaire ne disparaissant pas au cours des divisions successives est donc repérable avec une grande précision. Il a notamment permis de reconnaître tous les dérivés des crêtes neurales.

A. Premiers stades de segmentation



B. Blastula primaire



C. Formation de l'hypoblaste

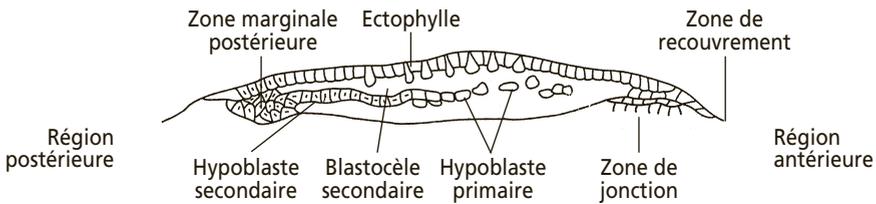


Figure 9.3 - Segmentation et formation de la blastula chez l'embryon d'Oiseau.

A : Premiers stades de segmentation de l'embryon d'Oiseau en vue polaire (Blastodisque, stades 2, 4, 8, 16 et 128 blastomères). **B :** Jeune blastula (stade 32 à 64 cellules), le blastocèle se forme par clivages horizontaux au-dessous des blastomères centraux; sa présence délimite l'aire pellucide. **C :** Formation de l'hypoblaste; ce feuillet provient de l'immigration dans le blastocèle primaire, de cellules isolées (hypoblaste primaire), qui sont progressivement incorporées dans le feuillet provenant de l'aire postérieure, l'hypoblaste secondaire.



Les cartes des territoires présomptifs obtenues présentent de légères variantes suivant la technique employée. La carte de la figure 9.5, établie par Vakaet (1985), ne représente pas le neurectoderme présomptif; il apparaît sur les schémas de la figure 9.4, établis d'après d'autres travaux.

Cette carte est établie au stade de la blastula secondaire et ne concerne que l'épiblaste, seul territoire organogène du futur embryon (voir *infra*).

Comme chez les Amphibiens (voir encart 8.1), les limites réelles entre les territoires ne sont pas aussi tranchées que semblent l'indiquer les schémas.

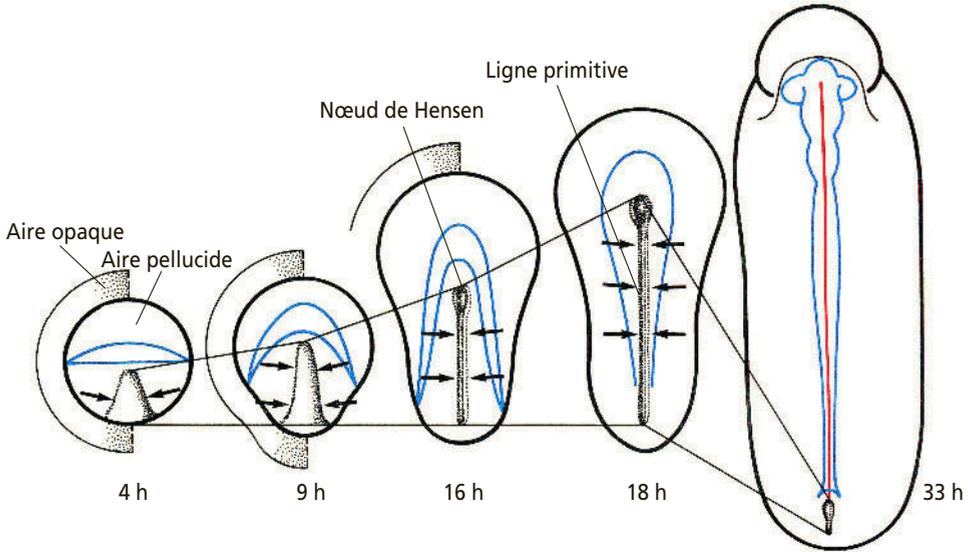


Figure 9.4 - Vue externe de l'embryon d'Oiseau pendant la gastrulation et le début de la neurulation.

4 h : Convergence des tissus vers un épaississement postérieur. **9 h** et suivantes : immigration au niveau de la ligne primitive et du nœud de Hensen, puis extension en profondeur. **33 h** : Le tube neural est formé. Le nœud de Hensen et la ligne primitive ont régressé. Entre 4 h et 18 h : Les lignes indiquent l'allongement de la ligne primitive. Entre 18 h et 33 h, elles montrent son raccourcissement. Le neurécotoderme est délimité en bleu, la position de la corde est indiquée en rouge.

9.3.1 Mise en place de l'hypoblaste

Un feuillet interne, l'**entophylle** ou **hypoblaste**, va doubler le feuillet externe, l'**ectophylle** ou **épiblaste** qui s'étend et s'amincit. Ces deux feuillets délimitent un **blastocèle secondaire** homologue du blastocèle des Amphibiens.

Le mode de formation de l'hypoblaste est encore discuté. Il se produit une première migration en profondeur dans le blastocèle primaire, de petits groupes de cellules ou de cellules isolées provenant de l'aire pellucide, elle forme l'**hypoblaste primaire**. Elle est suivie d'une seconde migration plus importante, dans le sens postéro-antérieur, d'un feuillet de cellules issues de la partie postérieure de l'aire pellucide qui s'est épaissie (la faucille de Koller). Ce feuillet constitue l'**hypoblaste secondaire** qui rejoint et repousse les îlots de cellules de l'hypoblaste primaire pour former l'hypoblaste (fig. 9.3c). La direction de cette dernière migration est déterminée par la rotation de l'œuf dans l'oviducte (fig. 9.2), la présence de l'hypoblaste détermine à son tour la migration des cellules du futur endo-mésoderme dans la moitié postérieure du disque embryonnaire (fig. 9.5).

Le disque germinatif comprendrait, répartis en zones concentriques, des territoires ayant des potentialités endodermiques et mésodermiques, qui ne s'expriment pas naturellement dans la moitié antérieure, mais seulement sous certaines conditions expérimentales (voir § 12.3.3). La limite de ces zones est évoquée par un tracé en pointillé fig. 9.5 A.



9.3.2 Formation de la ligne primitive

La symétrisation de l'œuf a lieu environ 5 heures avant la ponte et les territoires de l'endoderme se condensent à l'arrière du blastoderme (fig. 9.5 A). Dans les premières heures de l'incubation qui, chez la poule, dure 21 jours à 38 °C, il se forme, dans la zone marginale postérieure de l'aire pellucide, un épaississement qui progresse d'arrière en avant et se referme comme un éventail dont l'extrémité serait au centre du blastoderme, et les bras aux limites extrêmes du mésoderme présomptif (fig 9.5, 9.6). Cet épaississement résulte de la migration, vers l'arrière du disque embryonnaire, de certaines cellules dispersées dans l'épiblaste. Ces cellules dont la membrane contient un acide glycuronique sulfaté particulier seraient guidées (chimiotactisme) par une substance émise par l'hypoblaste et dont la concentration est maximale dans la zone marginale postérieure. Les cellules qui s'enfoncent alors sous l'épiblaste formeront l'endoderme et du mésoderme (Stem, 1991). Tandis que le blastoderme s'allonge dans le sens antéro-postérieur, cet épaississement en éventail s'allonge également et se referme en une **ligne primitive** avec un sillon médian, trace de l'immigration en profondeur des cellules du mésoderme ; elle est terminée par un renflement antérieur, le **nœud de Hensen**. Son développement est à son maximum après 18 heures d'incubation. Au fur et à mesure que la gastrulation se déroule, cette ligne régresse et le **prolongement céphalique** constitué par le mésoderme axial invaginé devient visible par transparence.

9.3.3 Mise en place de l'endoderme et du mésoderme

L'embryon se développe uniquement à partir de l'épiblaste de la blastula. Les tissus de l'aire opaque constituent l'ectoderme extra-embryonnaire dont les cellules du

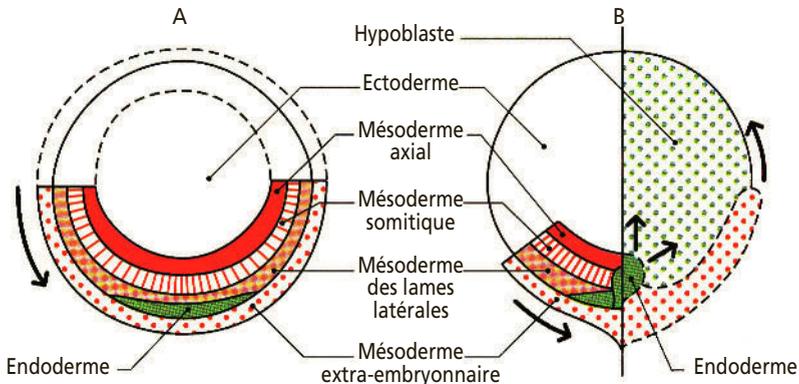


Figure 9.5 - Carte des territoires présomptifs du blastoderme de l'embryon d'Oiseau.

A : Avant la ponte. **B :** Vers 12 h d'incubation. Le feuillet superficiel a été enlevé sur le côté droit du schéma pour montrer les mouvements de l'endoderme et du mésoderme (tracés en pointillés). Sous l'équateur, les territoires de l'endo-mésoderme convergent, à la manière d'un éventail qui se referme, vers la ligne primitive puis divergent après immigration.

front migrent activement à la surface du jaune, prolifèrent et tendent à l'envelopper par épibolie. Elles sont à l'origine de l'ectoderme des annexes. Ce feuillet est doublé intérieurement par l'expansion du mésoderme extra-embryonnaire.

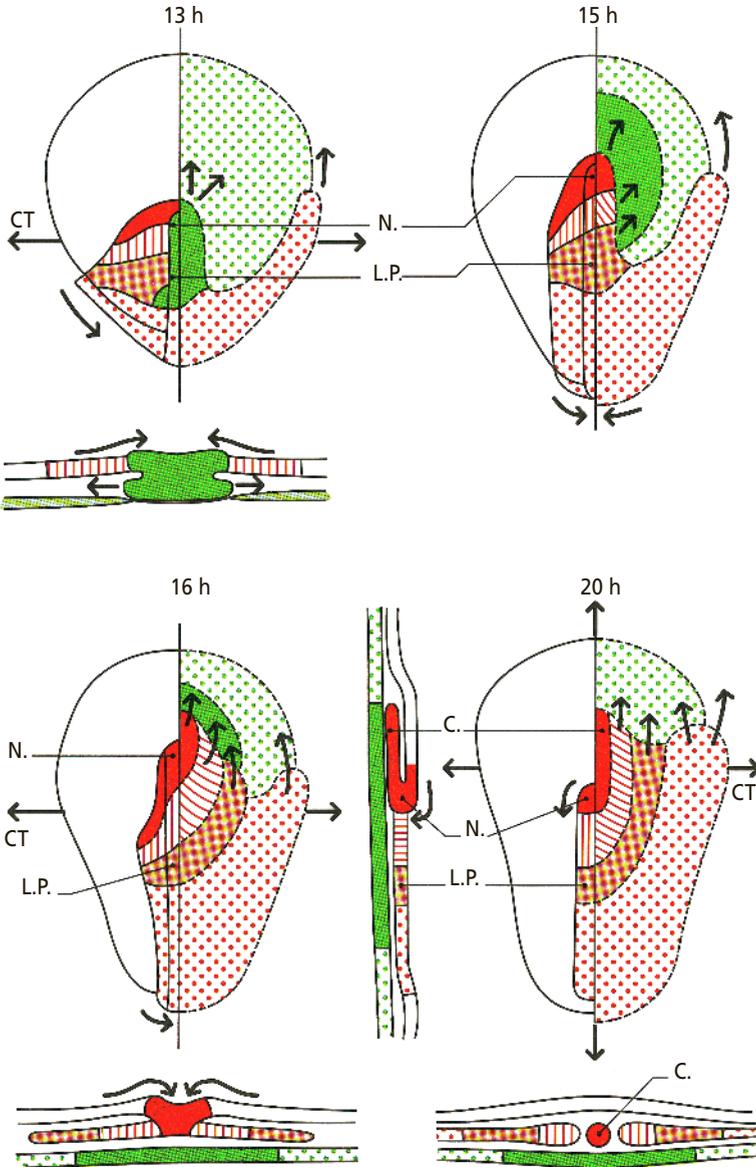


Figure 9.6 - Gastrulas d'embryon d'Oiseau vers 13, 15, 16 et 20 heures d'incubation.

Mêmes conventions que pour la fig. 9.5. Les coupes transversales sont établies aux niveaux CT ; la coupe sagittale est celle de l'embryon de 20 h. Les flèches indiquent les mouvements des feuilletts. C. : Corde, N. : Nœud de Hensen, L. P. : ligne primitive. À 13 h, l'endoderme s'insère dans le feuillet hypoblastique (voir coupe transversale).

Les mouvements gastruléens peuvent se décomposer comme chez les Amphibiens (fig. 9.6) : **convergence** des cellules du blastoderme vers la zone marginale postérieure où se forme la ligne primitive ; **immigration** en profondeur des cellules de l'endoderme et du mésoderme au niveau de la ligne primitive, ces cellules migrant isolément ou sous la forme d'un mésenchyme lâche ; **divergence** du mésoderme extra-embryonnaire et des lames latérales de part et d'autre de la ligne primitive (les cellules de l'endoderme et du mésoderme axial migrent vers l'avant au niveau du nœud de Hensen et restent dans la zone médiane) ; les mouvements d'**élongation** de l'embryon se poursuivent pendant toute la gastrulation ; celle-ci ne s'achève, à l'arrière de l'embryon, qu'avec la disparition totale de la ligne primitive, tandis que la neurulation est déjà terminée dans la région antérieure.

– **Les cellules de l'endoderme** qui migrent les premières, à partir de la 10^e heure, au niveau du nœud de Hensen, se dirigent vers l'avant (fig. 9.6) ; elles s'insèrent en l'écartant dans l'hypoblaste, le remplaçant dans l'axe antéro-postérieur de l'embryon et formant l'ébauche du tube digestif antérieur. L'hypoblaste, repoussé dans l'aire extra-embryonnaire, forme vers l'avant et latéralement le croissant germinal contenant les cellules germinales primordiales (voir § 17.1.3b) et va prolonger l'endoderme dans l'aire extra-embryonnaire. De l'endoderme migre aussi latéralement, de part et d'autre de la ligne primitive ; à l'arrière de l'aire pellucide, de l'endoderme de jonction a une destinée extra-embryonnaire.

– **La migration du mésoderme** débute vers la 14^e heure, tous ces tissus se mettent en place dans le blastocèle, entre l'épiblaste et le feuillet endo-hypoblastique (fig. 9.6). Elle commence dans la moitié postérieure de la ligne primitive par l'immigration et l'extension vers l'avant du mésoderme extra-embryonnaire. Lorsque commence le recul de la ligne primitive, le mésoderme axial, précordal et cordal, migre au niveau du nœud de Hensen à la suite de l'endoderme et migre dans l'axe de l'embryon ; la corde forme un axe dense, le prolongement céphalique. De part et d'autre du nœud de Hensen et de la moitié antérieure de la ligne primitive migrent successivement le mésoderme des lames latérales et celui des pièces intermédiaires qui divergent vers l'avant et latéralement ; le mésoderme des premiers somites s'installe en dernier lieu, sans s'étaler.

– **Fin de la gastrulation** : vers la 20^e heure d'incubation, il ne reste en surface que l'ectoderme, à l'exception d'une zone de prolifération intense au niveau du nœud de Hensen, où continuent à se former du neurectoderme et de la corde, et au niveau des parois de la ligne primitive, où se forment les mésodermes latéral et somitique de la partie postérieure de l'embryon.

L'ectoderme comprend le **neurectoderme** qui s'étend dans l'axe de l'embryon, au dessus de la zone de migration du mésoderme cordal et précordal (fig. 9.4) ; le reste de la surface de l'aire pellucide correspond à l'**épiderme**. Le mouvement de recul du nœud de Hensen et de la ligne primitive ne s'achève que vers la 48^e heure d'incubation, alors que l'organogenèse a déjà largement commencé.

A 18 heures, sont déjà en place les ébauches présomptives des divers organes sensoriels (placodes), des territoires organo-formateurs comme ceux du cœur etc. On peut considérer que ce stade correspond à celui de la fente blastoporale chez les Amphibiens.

9.4 NEURULATION (fig 9.7 et 9.8)

9.4.1 Mouvements généraux des feuilletts

Les **plis neuraux** apparaissent après 20-21 heures d'incubation, de part et d'autre du neurectoderme, délimitant la plaque neurale et se rencontrent dans l'axe médian au niveau du cerveau moyen après 26 heures. La fermeture progresse vers l'avant, isolant le cerveau antérieur vers 30-33 heures. La fermeture du tube neural s'achève au niveau caudal après 44 heures d'incubation.

L'embryon commence à se détacher de la masse de l'œuf : la région antérieure se soulève au-dessus du blastoderme. Il se forme alors un **repli céphalique** ectodermique ventral qui entraîne la délimitation de l'**intestin antérieur** en repliant avec lui l'endoderme sous-jacent. Le même pincement délimitera plus tard l'**intes-**

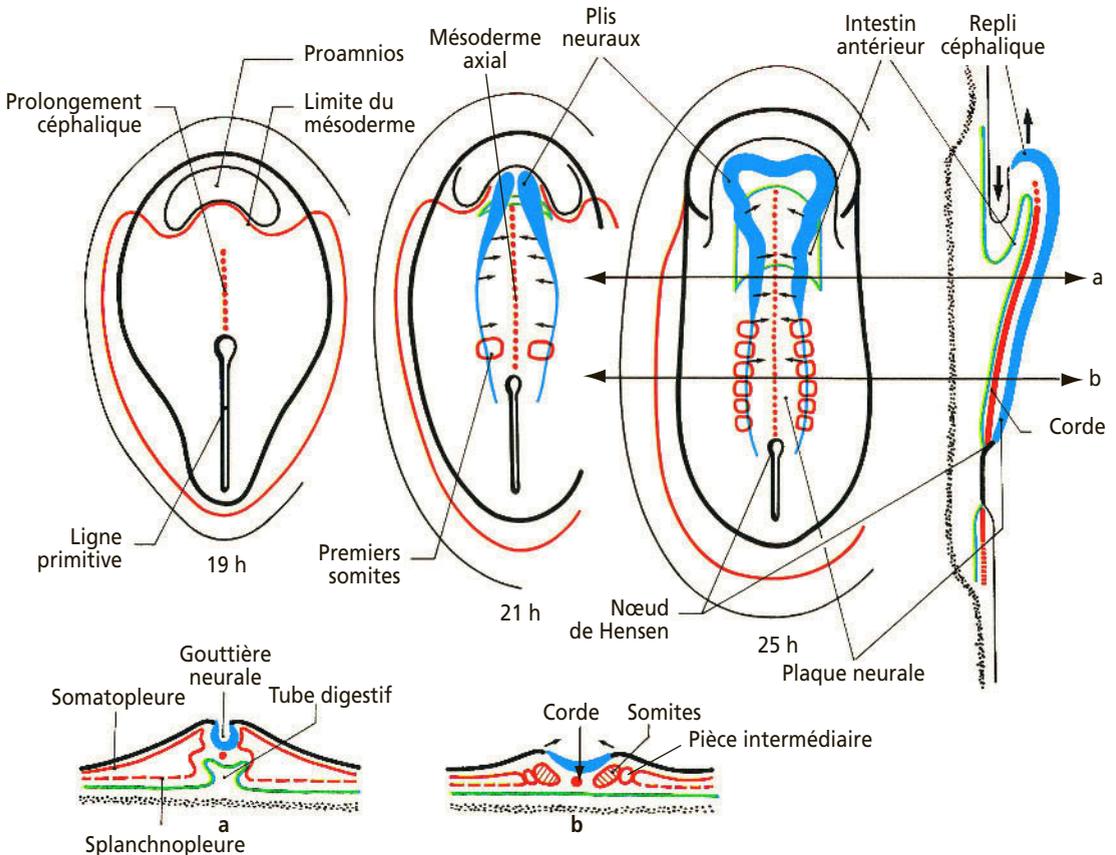


Figure 9.7 - Neurulation chez l'embryon d'Oiseau.

3 stades sont représentés : 19 h, 21 h et 25 h. La coupe sagittale (à droite) et les 2 coupes transversales (a et b en bas) correspondent au stade 25 heures. L'embryon étant translucide, les différents niveaux sont visibles. Les lignes a et b permettent de situer le niveau des structures observées sur les coupes a et b.

tin postérieur ; les deux ébauches se rencontrent au bout de 4 jours ; la communication entre le tube digestif et le vitellus sous-jacent est alors réduite à un simple tube, le **pédicule vitellin**.

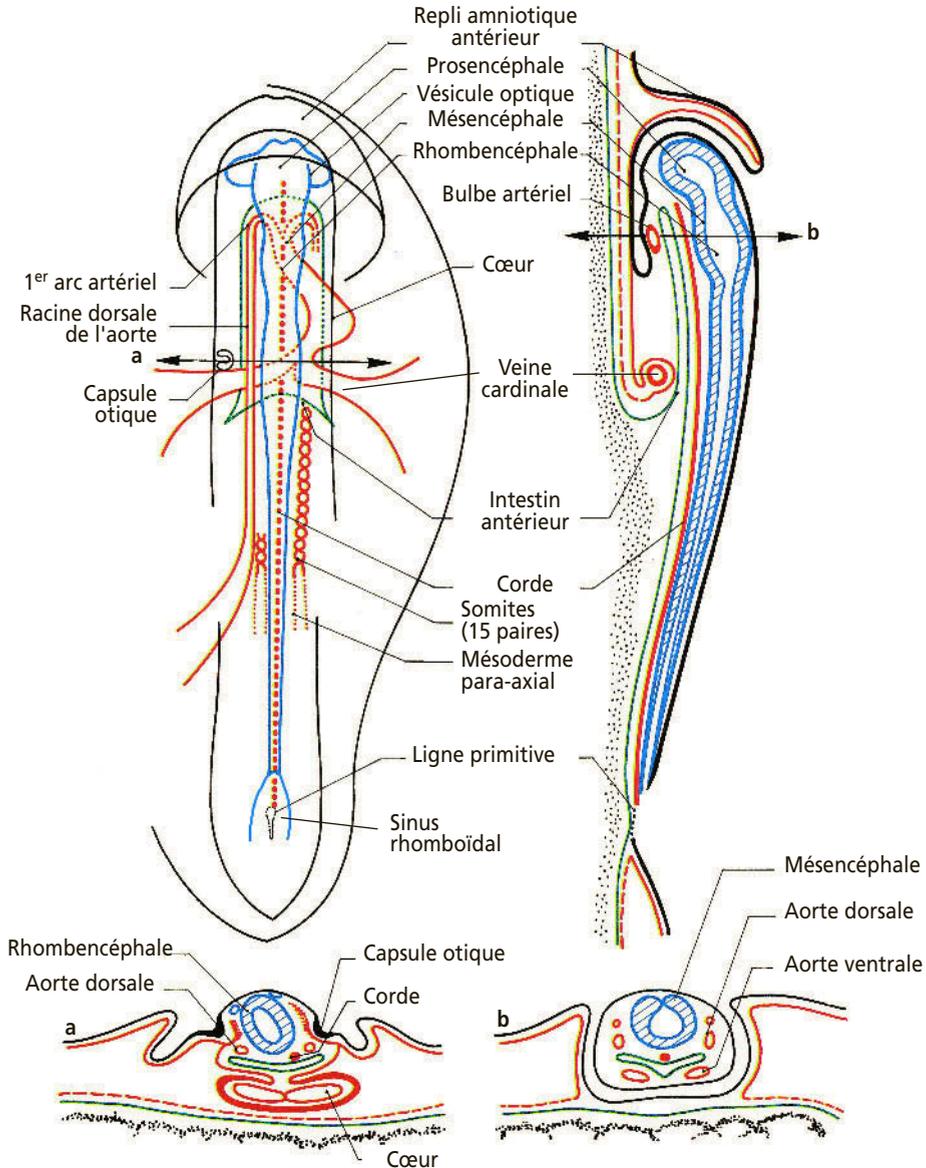


Figure 9.8 - Embryon d'Oiseau de 33 heures en vue dorsale et en coupes sagittale et transversales.

L'organogenèse a commencé : l'encéphale se découpe en 3 vésicules cérébrales, les vésicules optiques sont formées. Le cœur est déjà fonctionnel. L'intestin antérieur est délimité. Le repli amniotique antérieur recouvre la tête.

Les **somites** se différencient à partir de la 20^e heure d'incubation, la métamérisation découpant le mésoderme somitique à raison d'1 paire par heure et demie environ d'incubation (voir § 15.6). Les pièces intermédiaires s'individualisent. Les lames latérales se rejoignent ventralement sous le pharynx en avant de la zone des somites. Des ébauches paires qui s'en détachent fusionnent pour former le tube cardiaque.

Les **lames latérales extra-embryonnaires** s'insinuent dans l'aire opaque à la périphérie du blastoderme. C'est dans la paroi de leur splanchnopleure que se différencient les îlots sanguins avec les premières cellules sanguines. Ces îlots se ramifient et fusionnent en une aire vasculaire extra-embryonnaire. Les lames latérales extra-embryonnaires entreront dans la constitution des annexes embryonnaires.

Le **nœud de Hensen** et la **ligne primitive** continuent de reculer et de se raccourcir en direction caudale, tandis que la gastrulation se poursuit.

9.4.2 Nœud de Hensen et ligne primitive

Chez les Amphibiens, il est aisé de décrire successivement les mouvements de la gastrulation suivis de ceux de la neurulation. Chez les Oiseaux, ainsi que chez les Mammifères, la situation est plus complexe, et la neurulation s'achève dans la région céphalique d'un embryon, tandis que les mouvements gastruléens se poursuivent au niveau des futures zones thoracique, abdominale et caudale, ce qui a été évoqué plus haut. Il nous a paru utile d'insister sur ce point en énumérant quelques résultats acquis notamment grâce à des expériences de greffes caille-poulet.

Ces expériences sont réalisées lorsque l'embryon atteint 26 heures, 6 paires de somites sont alors individualisées. La fermeture de la plaque neurale est en cours au niveau du futur encéphale. En arrière, au niveau du tronc, les bords postérieurs de la gouttière neurale s'écartent et s'amincissent, délimitant l'aire allongée et légèrement déprimée du **sinus rhomboïdal**, dans l'axe duquel on retrouve le nœud de Hensen et la ligne primitive (fig. 9.8). Tandis que l'embryon, s'allonge cette structure recule vers l'arrière. Des greffons prélevés sur le nœud de Hensen, la ligne primitive et le sinus rhomboïdal d'embryons de caille sont transplantés aux mêmes emplacements sur des embryons de poulets après que ceux-ci aient subi des excisions de territoires correspondants.

On a pu ainsi montrer que les cellules du nœud de Hensen sont à l'origine de la corde et du plancher du tube neural, depuis le thorax jusqu'à la région caudale. Les parois latérales et dorsale du tube proviennent des aires latérales du sinus rhomboïdal. Une population de cellules distinctes, également incluses dans le nœud de Hensen fournit de l'endoderme dorsal. Les cellules de la ligne primitive fournissent le mésoderme des lames latérales, des pièces intermédiaires et des somites.

Cette morphogenèse est le résultat à la fois de migrations et de proliférations cellulaires que nous ne détaillerons pas.

Les plis neuraux achèvent de se rejoindre au bout de 44 heures. L'embryon devient asymétrique, il se couche sur sa gauche, dans sa partie antérieure au bout de 33 heures, au niveau du tube cardiaque, tandis que les vésicules cérébrales et la région cardiaque se différencient et croissent rapidement. L'acquisition de l'asymétrie est étudiée § 15.7.1.

9.5 ANNEXES EMBRYONNAIRES (fig 9.9 et 9.10)

Ce sont des formations d'origine ectodermique, mésodermique et endodermique qui se développent hors du corps de l'embryon proprement dit, et qui assurent des fonctions de protection, d'absorption des réserves, de respiration, de stockage et d'élimina-

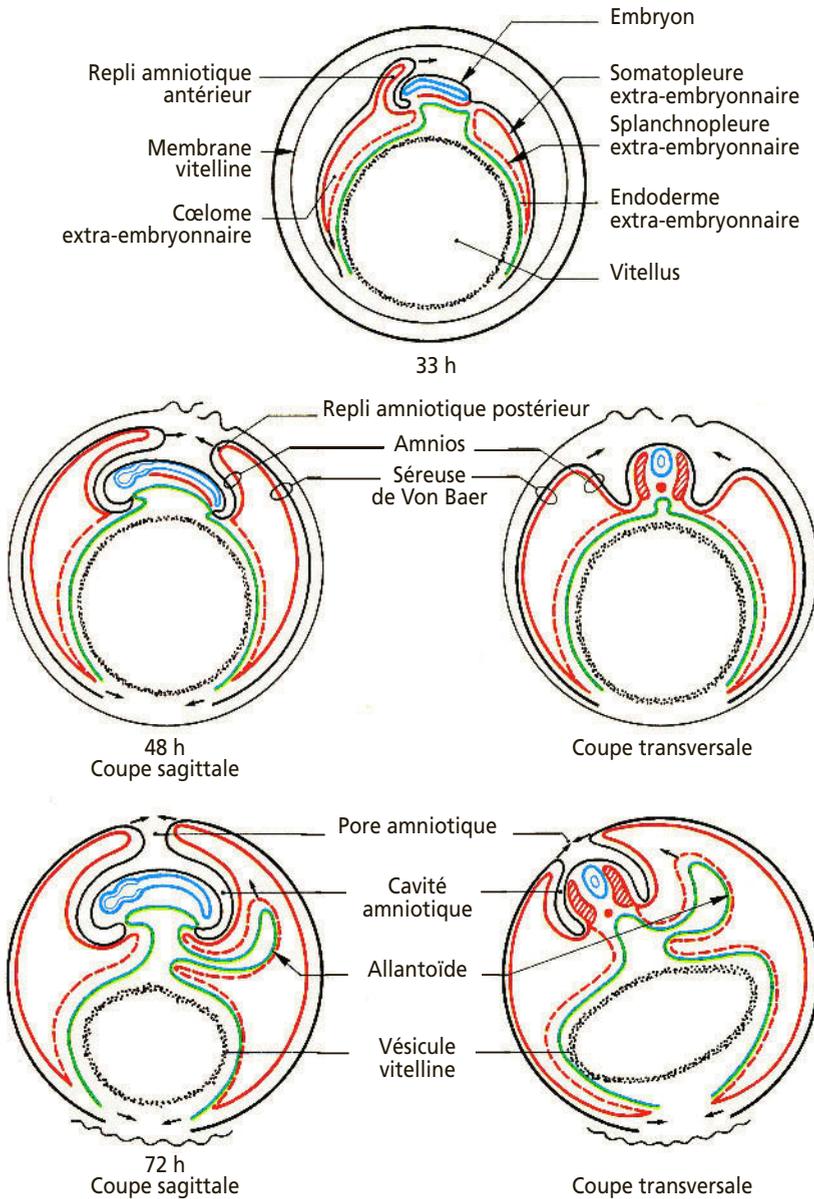


Figure 9.9 - Formation des annexes embryonnaires à 33 h, 48 h et 72 h.

La taille de l'embryon et celle des annexes ont été exagérées par rapport à celle du vitellus. Les stades 48 et 72 h sont représentés en coupes transversales et sagittales.

tion des déchets. Vers 20-24 heures d'incubation, le corps de l'embryon commence à se distinguer des tissus périphériques ; les **plis antérieur, postérieur et latéraux** le soulèvent et l'isolent de la masse vitelline. Pendant ce temps, les feuilletts embryonnaires s'étendent hors du corps de l'embryon et vont contribuer à former les annexes : **vésicule vitelline, amnios** et **allantoïde**. Celles-ci s'individualisent tandis que l'isolement de l'embryon par rapport à la masse de l'œuf s'accroît rapidement. À 96 heures d'incubation, il n'est plus relié à la vésicule vitelline et à l'allantoïde que par les pédicules vitellin et allantoïdien. La **cavité amniotique** l'entoure alors complètement. Ces mêmes annexes vont se retrouver au cours de l'ontogenèse des Mammifères.

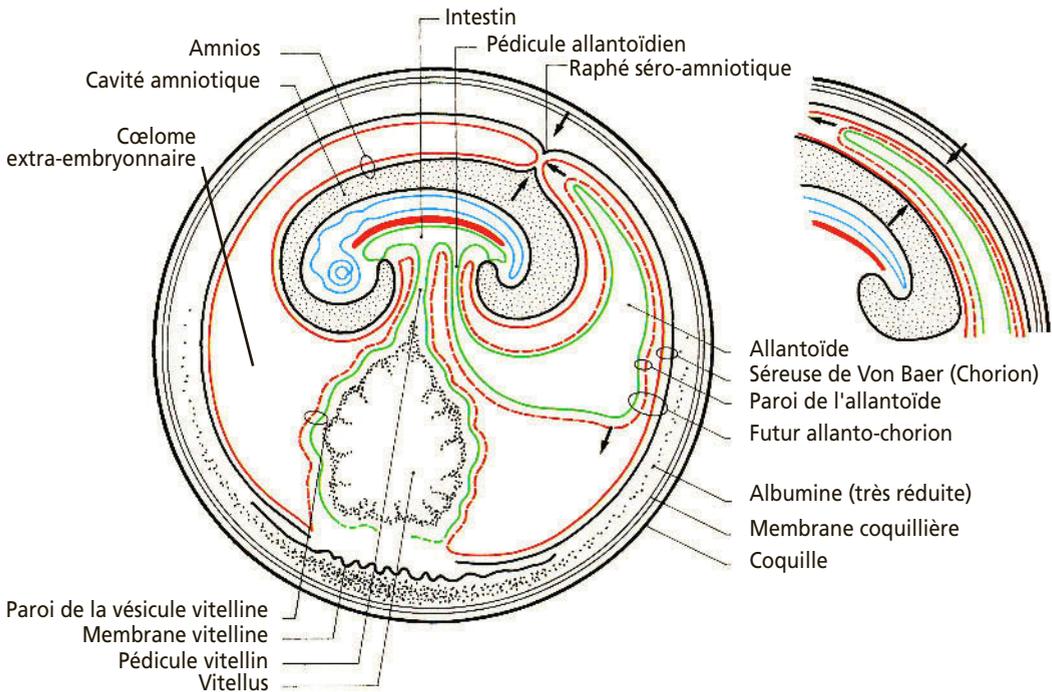


Figure 9.10 - Coupe sagittale d'embryon de 96 heures avec ses annexes.

La taille du vitellus et de l'albumine ont été considérablement réduites de façon à donner une vue de ce que seront les relations entre l'allanto-chorion et la coquille dans la suite du développement. Encart : Expansion ultérieure de l'allantoïde au-delà des limites du raphé séro-amniotique, marqué par des flèches.

9.5.1 Vésicule vitelline

L'endoderme n'est qu'un mince feuillet aplati au-dessus d'une petite cavité, l'archentéron.

Tandis que l'archentéron en se refermant vers l'avant, l'arrière et les côtés va donner le tube digestif de l'embryon, les tissus endodermiques et l'hypoblaste qui le prolongent vont proliférer hors de l'embryon, s'étaler à la surface du jaune, tendre à l'englober et à constituer la vésicule vitelline (fig. 9.9).

Cet endoderme extra-embryonnaire est suivi dans sa croissance par le mésoderme extra-embryonnaire, creusé d'un coelome extra-embryonnaire. Celui-ci est délimité par un feuillet externe ou **somatopleure** et par un feuillet interne ou **splanchnopleure**, plaqué contre l'endoderme, lui-même en contact avec la masse vitelline. Des vaisseaux sanguins se différencient dans le mésoderme splanchnique entraînant une riche vascularisation de la vésicule vitelline, ce qui permet le transfert des réserves vers l'embryon. En effet, l'endoderme sécrète des enzymes qui fragmentent les granules vitellins et les rendent assimilables. L'ectoderme extra-embryonnaire double ces formations vers l'extérieur. Ces feuillettes n'englobent jamais totalement le vitellus.

9.5.2 Cavité amniotique

La cavité amniotique se forme à partir de 30 à 33 heures d'incubation. C'est le résultat de la soudure d'un repli de l'ectoderme doublé de la somatopleure extra-embryonnaire, situé en avant de la tête, qui se soulève à 30 heures (**repli amniotique céphalique**) et d'un repli postérieur de même nature qui apparaît à 48 heures (**repli amniotique caudal**). Ils progressent l'un vers l'autre, prolongés par des replis latéraux. La fermeture totale se fait à 96 heures.

L'embryon se développe dans cette cavité, isolé du milieu environnant. Il baigne dans un liquide qui provient de la déshydratation de l'albumine. Le feuillet externe du repli constitue la **séreuse de Von Baer** ou **chorion** qui vient s'appliquer contre la membrane coquillière. Le feuillet interne est l'**amnios stricto sensu**. Chacun d'eux est formé d'ectoderme doublé de somatopleure.

Ils sont séparés par le coelome extra-embryonnaire ou **cavité séro-amniotique** qui va se trouver rapidement comblée par le développement de la troisième annexe importante : l'**allantoïde** (fig. 9.9).

La présence de cellules contractiles au niveau de l'amnios permet un brassage du contenu de la cavité, ce qui permet d'éviter le risque d'un accolement de l'embryon contre les parois de l'amnios susceptible d'engendrer des malformations. Par la mise en mouvement du liquide amniotique, l'embryon flotte dans ce dernier et peut se développer harmonieusement dans les trois directions de l'espace.

La mise en place de l'amnios a joué un rôle décisif dans l'évolution des Vertébrés. En effet, cette annexe en assurant à l'embryon une protection contre les risques d'une déshydratation, a permis aux espèces l'ayant développée de se libérer du milieu aquatique pour accomplir tout ou partie de leur cycle vital. Le développement embryonnaire peut s'effectuer dans ces conditions en milieu aérien terrestre soit *in ovo* (c'est le cas ici) soit *in utero* (voir chapitre suivant).

9.5.3 Allantoïde

a) Mise en place

C'est un diverticule endodermique, issu de la face ventrale de l'intestin postérieur, qui apparaît à 60 heures d'incubation. Sa croissance est rapide. Il repousse devant lui une lame mésodermique, la splanchnopleure, qui le double.

L'allantoïde envahit tout le cœlome extra-embryonnaire et entoure l'amnios et la vésicule vitelline en refoulant l'albumine. L'embryon à 14 jours sera entouré à la fois par l'amnios et par l'allantoïde.

b) Fonctions de l'allantoïde

- **Respiratoire.** Le feuillet mésodermique qui double l'allantoïde, la splanchnopleure extra-embryonnaire, est vascularisé et s'applique contre la séreuse, c'est-à-dire l'association de l'ectoderme et de la somatopleure extra-embryonnaire. L'ensemble forme un **allanto-chorion**, très vascularisé où se font les échanges respiratoires à travers la coquille.

On retrouve les mêmes feuillets chez les Mammifères, dans le placenta fœtal qui contracte des rapports étroits avec la muqueuse utérine où se font les échanges respiratoires.

- **Nutritive.** L'allanto-chorion est un site d'absorption d'une partie des sels de Ca^{++} de la coquille à laquelle il est accolé ; ils sont mobilisés et utilisés notamment pour la formation du squelette, ce qui entraîne la fragilisation de la coquille.

L'allantoïde absorbe aussi en partie l'albumine, ou blanc de l'œuf.

- **Excrétrice.** L'allantoïde accumule les déchets éliminés par les reins (la vessie, chez les Vertébrés amniotes adultes, est d'ailleurs l'homologue du pédoncule allantoïdien de l'embryon qui relie l'intestin postérieur à la vésicule allantoïdienne).

9.5.4 Destinée des annexes après l'éclosion

L'amnios, l'allantoïde et la séreuse sont éliminés en même temps que la coquille. L'albumine a été totalement utilisée.

Il reste 1/3 à 1/5 du jaune. Il se rétracte à l'intérieur de la cavité abdominale de l'embryon et se trouve incorporé à l'intestin moyen ; il sera utilisé dans les deux premières journées de la vie libre.

Conclusion

Cette description des premiers stades du développement montre qu'à partir d'un plan d'organisation différent de l'œuf d'Amphibien, on aboutit à de grandes similitudes et à des homologies parfaites entre l'organogenèse des Oiseaux et celle des Amphibiens.

Une différence essentielle est liée au mode de segmentation dû au vitellus et au développement d'organes transitoires, les annexes, qui protègent l'embryon et lui permettent d'utiliser les réserves vitellines qui restent externes au corps de l'embryon proprement dit.

Questions

- 9.1 À quel type d'œuf celui des Sauropsidés se rattache-t-il ?
- 9.2 Quel est le type de segmentation observé chez les Oiseaux ?
- 9.3 Dans un œuf de poule, quelle est la partie correspondant à la cellule-œuf ?
- 9.4 L'hypoblaste correspond-t-il à un feuillet embryonnaire ?
- 9.5 Au bout de combien de jours d'incubation à 38 °C l'éclosion se réalise-t-elle ?
- 9.6 À partir de quel moment du temps d'incubation voit-on apparaître des somites et selon quel rythme ?
- 9.7 Quelles différences fondamentales observe-t-on entre le développement d'un amphibien et celui d'un oiseau ?
- 9.8 Qu'appelle-t-on séreuse de Von Baer ?
- 9.9 Quel apport évolutif la mise en place d'une cavité amniotique constitue-t-elle ?
- 9.10 Quelles sont les principales fonctions exercées par l'allantoïde ?

Réponses page 386

DÉVELOPPEMENT DES MAMMIFÈRES

10

PLAN

- 10.1 Structure de l'œuf et de ses enveloppes
- 10.2 Segmentation
- 10.3 Gastrulation
- 10.4 Neurulation
- 10.5 Développement de l'amnios et de la vésicule vitelline
- 10.6 Évolution des annexes embryonnaires et formation du placenta
- 10.7 Rapports entre les parties maternelles et embryonnaires du placenta

10.1 STRUCTURE DE L'ŒUF ET DE SES ENVELOPPES

L'ovocyte des Mammifères supérieurs est **alécithe**. La zone superficielle du cytoplasme, ou cortex, possède un cytosquelette avec un réseau de microfilaments d'actine. Des granules corticaux, dont on a étudié le rôle pendant la fécondation, sont présents chez certaines espèces (lapin, hamster, homme), et absents chez d'autres (rat).

Il existe, dans les très jeunes ovocytes de certaines espèces, une organisation polarisée, l'axe pôle animal-pôle végétatif se matérialisant par la superposition de la vésicule germinative, vers le pôle animal et d'une structure appelée corps vitellin ou **corps de Balbiani** vers le pôle végétatif. Cette dernière, formée par la condensation en proportion variable de mitochondries, de réticulum endoplasmique et de corps de Golgi, se disperse avec la croissance de l'ovocyte. Rien n'indique que la redistribution de ces organites dans le cytoplasme puisse contribuer à fournir une polarité à l'ovocyte mûr.

Cet ovocyte est entouré, à la ponte, par la **zone pellucide**, qui est une enveloppe primaire, et les cellules de la **corona radiata**, qu'on assimile à une enveloppe secondaire. Après la fécondation, l'œuf se segmente dans l'oviducte puis s'implante dans la muqueuse utérine et acquiert des annexes embryonnaires homologues de celles des Sauropsidiés (Oiseaux et Reptiles). Ces annexes participent à l'édification du **placenta**, formation qui établit le contact avec l'organisme maternel. Ce placenta n'existe pas chez les Mammifères Monotrèmes (ornithorynquéchidné) qui sont ovipares ; il est rudimentaire chez les Marsupiaux (kangourou, opossum) ; il n'est développé que chez les Mammifères placentaires vrais ou Euthériens, qui seuls seront étudiés ici.

10.2 SEGMENTATION (fig 10.1)

La segmentation de l'œuf de Mammifère est totale ou holoblastique. Elle est très lente. L'œuf est fécondé entre 12 et 24 heures après la ponte ovulaire et la première division ne survient dans l'oviducte que vers la 30^e heure chez la femme, les divisions suivantes se succèdent à des intervalles de plus en plus courts. C'est une morula compacte de 16 blastomères qui atteint la partie supérieure de l'utérus au 4^e jour. L'œuf a perdu progressivement sa corona radiata après la fécondation et ne reste entouré que de la zone pellucide qu'il perd à son entrée dans l'utérus, à la fin du stade morula. Il utilise ses faibles réserves et les sécrétions de l'oviducte jusqu'au moment de la nidation, c'est-à-dire de son implantation dans la muqueuse utérine.

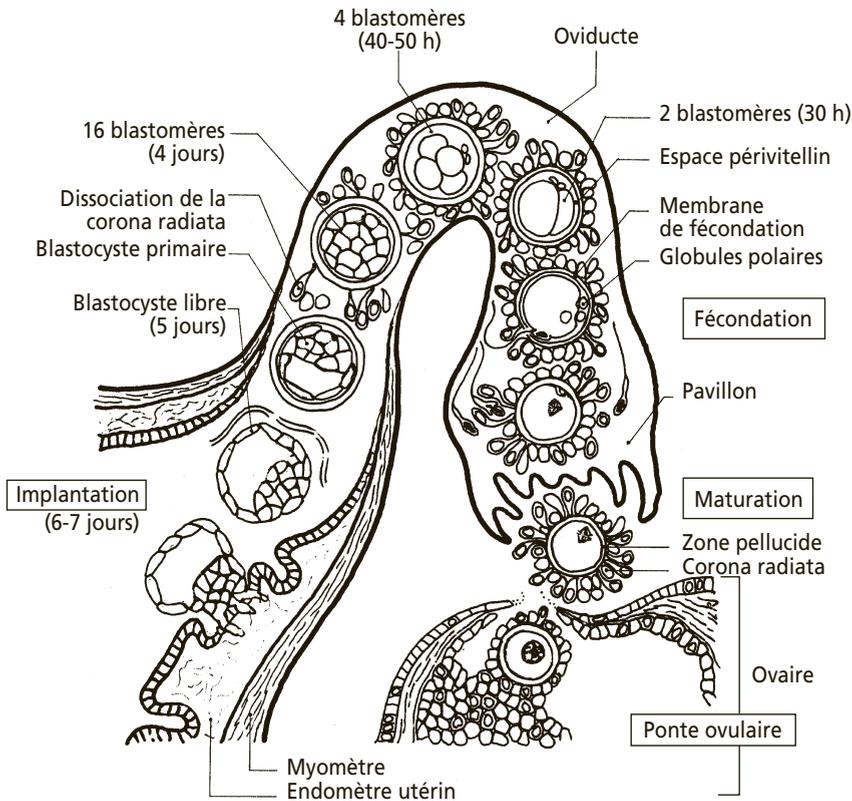


Figure 10.1 - Développement de l'œuf humain depuis la ponte ovulaire jusqu'à son implantation dans la muqueuse utérine.

10.2.1 Morula et blastula primaire (ou blastocyste primaire)

La segmentation est asynchrone, légèrement inégale dans certaines espèces, et présente des caractéristiques propres à ce groupe quant à l'orientation de ses plans de segmentation et à l'adhérence entre les blastomère.

C'est une **segmentation rotationnelle**, décrite précédemment, (fig. 5.1D). Son asynchronisme fait qu'on peut observer des morulas avec un nombre impair de

cellules. Des observations anciennes ont décrit, chez le chat, une filiation à partir des deux premiers blastomères différant par leur taille et leur coloration, l'un, petit et sombre à segmentation lente étant à l'origine du **bouton embryonnaire** ou **masse cellulaire interne** et l'autre, clair et se divisant plus rapidement, à l'origine de la partie extra-embryonnaire, le **trophectoderme** qui évoluera en **trophoblaste**. Ces observations ne semblent pas avoir été confirmées dans d'autres espèces.

L'adhérence entre les blastomères est très lâche jusqu'au stade 8 cellules, chacun d'eux restant bien distinct avec des surfaces de contact réduites. Au cours du stade 8 survient un changement rapide et profond propre aux Mammifères, la **compaction** qui transforme l'embryon en une morula sphérique où les limites cellulaires sont difficilement discernables. Des jonctions cellulaires de type jonctions serrées se développent alors entre les parois latérales des cellules de la surface externe de la morula ; ces cellules acquièrent ainsi une polarité. Les jonctions assurent l'étanchéité entre le milieu externe et l'intérieur de l'embryon. Au stade 16 cellules, la plupart de ces cellules entrent dans la constitution de l'enveloppe externe qui sera à l'origine du trophectoderme, et quelques cellules internes seulement donneront le bouton embryonnaire. Au stade 32 cellules, chez la souris par exemple, leur orientation vers l'une ou l'autre voie se définit selon la position profonde ou superficielle des cellules et de l'orientation des plans de clivage.

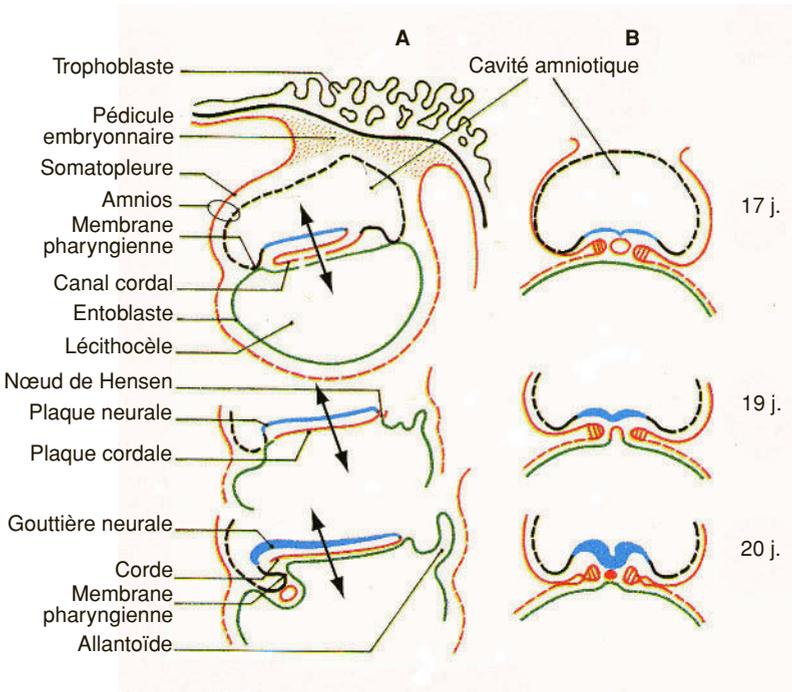


Figure 10.2 - Coupes sagittales (A) et transversales (B) de gastrulas d'embryon humain à 17, 19 et 20 jours.

La corde est d'abord une invagination tubulaire (17 j.) qui s'ouvre et se soude provisoirement à l'entoblaste (19 j.), puis s'isole en corde proprement dite (20 j.). Le pédicule allantoïdien se développe dès le 19^e jour. L'ébauche cardiaque est en place à 20 jours.

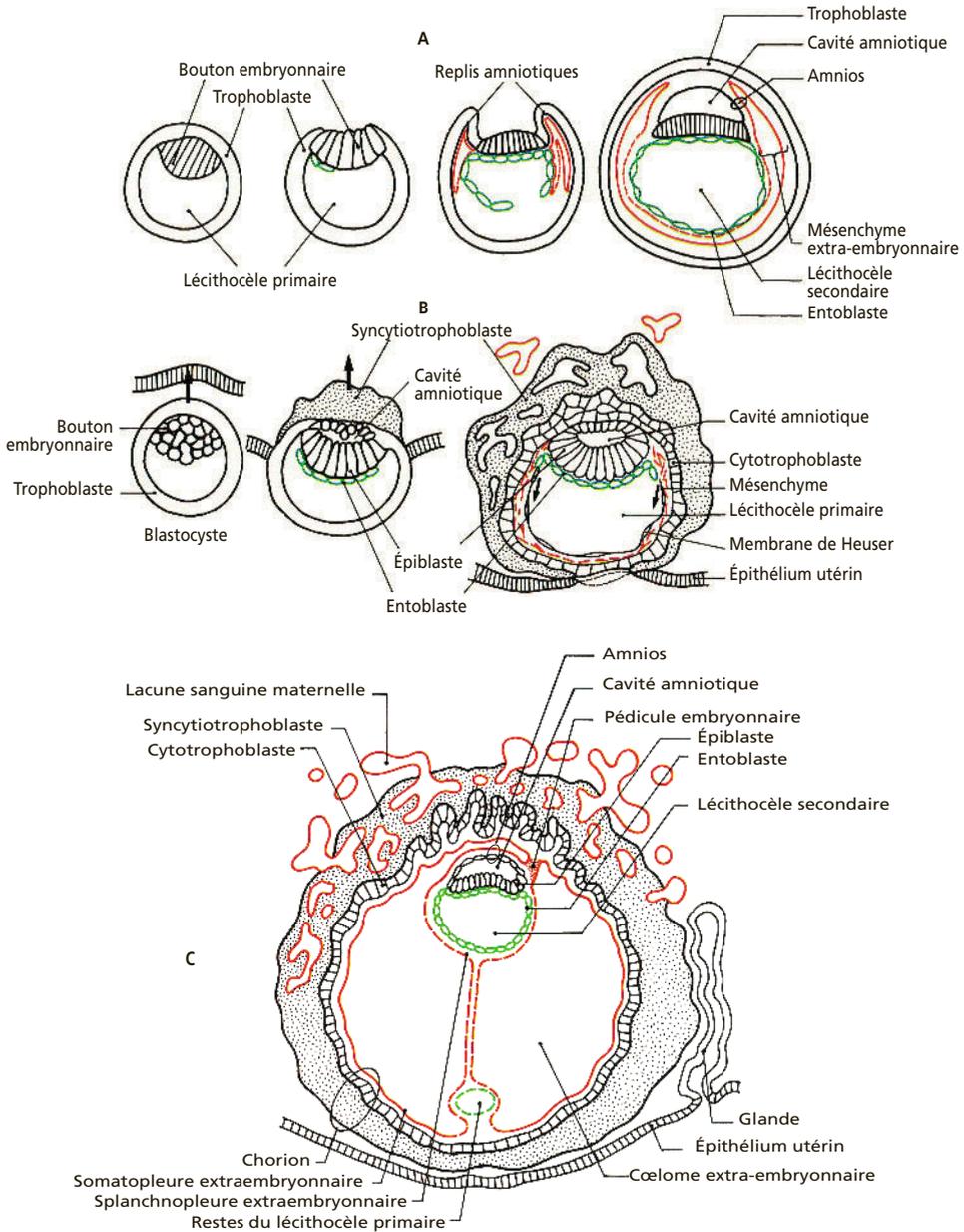


Figure 10.3 - Formation de la cavité amniotique chez l'embryon de Mammifère.

A : Par plissement (type Carnivore) : érosion du trophoblaste au niveau du bouton embryonnaire, apparition de replis amniotiques antérieur et postérieur. Simultanément, développement de l'entoblaste qui tapisse le lécithocèle. Mise en place du méscnyme extra-embryonnaire et du cœlome. **B** et **C** : Par cavitation (homme) : la cavité amniotique apparaît par clivage dans la partie supérieure du bouton embryonnaire. Le syncytiotrophoblaste est hypertrophié et lacunaire. Le lécithocèle est réduit, le cœlome extra-embryonnaire est mieux développé que dans le modèle précédent.

La blastula primaire qui se forme comprend deux catégories de cellules bien distinctes chez les Primates :

- Le **trophectoderme**, assise de cellules périphériques à l'origine d'une partie des annexes embryonnaires et qui joue un rôle dans la formation du placenta.
- Le **bouton embryonnaire**, amas cellulaire sous le trophectoderme regroupant les territoires organo-formateurs de l'embryon.

La blastula se creuse d'une cavité ou **lécithocèle primaire** vers le stade 32 cellules. Elle arrive alors au contact de la muqueuse utérine (6^e jour chez la femme). Les contacts s'établissent par l'intermédiaire du trophectoderme après rupture de la membrane pellucide sous l'effet d'une protéase, la strypsine. Le degré d'implantation dans la muqueuse utérine est fonction de la nature du placenta chez l'espèce considérée (voir § 10.7).

10.2.2 Blastula secondaire (ou blastocyste secondaire)

Comme chez les Oiseaux, l'entoblaste (ou hypoblaste, ou endoderme primaire) se met en place avant la gastrulation. Il apparaît comme une couche de cellules très aplaties sur la face inférieure du bouton embryonnaire. Son origine n'est sans doute pas identique chez toutes les espèces. Il peut être le résultat d'une délamination de la couche basale du bouton embryonnaire (ex. : brebis, femme). Dans d'autres espèces (rat), l'entoblaste proviendrait de la prolifération de cellules originaires du trophoblaste qui s'étalent sous la voûte du lécithocèle au contact du bouton embryonnaire ; cette interprétation (Dalcq, 1954), est fondée sur des caractéristiques cytochimiques des cellules de l'entoblaste qui sont analogues à celles du trophoblaste.

Quoi qu'il en soit, l'embryon est alors didermique. Dans l'espèce humaine, le mésoderme extra-embryonnaire se met en place sous une forme mésenchymateuse cependant que l'entoblaste prolifère en doublant l'intérieur du lécithocèle primaire (fig. 10.2B). Celui-ci, délimité initialement par une structure cellulaire aplatie, la **membrane de Heuser**, devient un lécithocèle secondaire considéré comme l'homologue de la vésicule vitelline des Oiseaux. Le bouton embryonnaire serait à titre de comparaison, l'homologue de l'aire pellucide.

10.3 GASTRULATION (fig 10.2 et 10.4)

La gastrulation commence lorsque l'amnios et le chorion achèvent de se former, et que la nidation a eu lieu.

L'ébauche de l'embryon ou disque embryonnaire est didermique lorsque la gastrulation commence. En surface il se compose de l'épiblaste, en profondeur, de l'entoblaste. Le disque embryonnaire s'allonge. Près du bord postérieur de l'aire embryonnaire se forme un nodule, le **nœud postérieur**. Plus près du centre un autre épaissement forme le **nœud antérieur** ou **nœud de Hensen**. Une ligne médiane réunit les deux nœuds et marque ainsi le plan de symétrie bilatérale de l'embryon, c'est la ligne primitive qui se creuse en gouttière.

Ce stade correspond à un blastoderme d'Oiseau de 18 heures d'incubation mais qui serait recouvert par l'amnios. Il est atteint chez l'homme vers le 15^e ou 16^e jour.

Les mouvements morphogénétiques et la mise en place des feuilletts (fig. 10.4) sont analogues à ceux des Oiseaux. Les coupes sagittale et transversale précisent l'organisation du disque embryonnaire au début de la gastrulation (fig. 10.2).

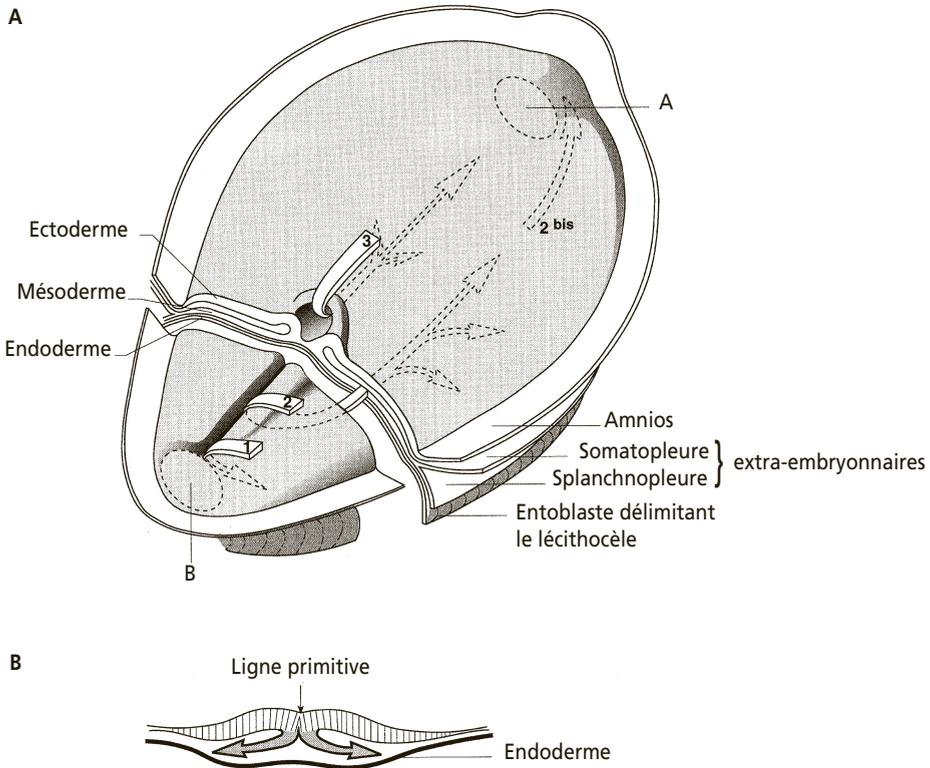


Figure 10.4 - Disque embryonnaire au cours de la gastrulation.

A : Vue externe. Les flèches indiquent le sens des mouvements des feuilletts mésodermiques qui se mettent en place. 1 : mésoderme caudal ; 2 et 2bis : mésoderme latéral ; 3 : canal cordal. A et B : zones des futures membranes pharyngienne et cloacale, dépourvues de mésoderme. **B** : Mouvements des feuilletts au niveau de la ligne primitive. (d'après Tuchman-Duplessis).

a) Le matériel cordonmésodermique

Il s'invagine au niveau du nœud de Hensen. Toute la région en avant de celui-ci s'accroît énormément et le nœud de Hensen semble, comme chez les Oiseaux, reculer vers l'extrémité caudale. La corde se situe sous le neurectoderme qu'elle va induire à former du tissu nerveux. Chez les Mammifères, la corde qui est d'abord une invagination tubulaire, le **canal cordal**, s'ouvre ventralement et se soude à l'entoblaste pour former une **plaque cordale**. Cette association est transitoire, la corde s'isole à nouveau pour former un cordon cellulaire plein lors de la mise en place de l'endoderme.

b) Le mésoderme des somites et des lames latérales

Il s'invagine latéralement le long de la ligne primitive et s'étend de part et d'autre de la corde. Les somites commencent à se métamériser à la fin de la gastrulation, avec 4 paires à 21 jours chez l'homme. Les lames latérales entrent en continuité avec le mésoderme extra-embryonnaire.

c) L'endoderme

Il proviendrait, au moins pour partie, du matériel épiblastique invaginé lors de la gastrulation, qui s'insérerait dans l'entoblaste. Il est ainsi en continuité avec la vésicule vitelline ; il se forme un pincement endodermique antérieur ou repli céphalique, qui correspond à l'apparition de l'intestin antérieur. L'allantoïde se développe dans la région postérieure de l'endoderme.

Après 17 jours de développement chez un embryon humain, le schéma d'organisation correspond à celui d'un oiseau après une vingtaine d'heures d'incubation.

10.4 NEURULATION (fig 10.5)

Le neurectoderme situé dans l'axe médian du disque embryonnaire, au-dessus de la corde à la fin de la gastrulation, est induit à former la plaque neurale qui s'épaissit en raquette. Les bords latéraux se soulèvent (gouttière neurale) et se rejoignent formant le tube neural qui achève de se clore d'abord dans le milieu, puis vers l'avant et vers l'arrière, tandis que la ligne primitive achève de régresser. Chez l'embryon humain, le tube neural commence à se former le 21^e jour. Il est fermé le 29^e jour de gestation.

Pendant la formation de l'ébauche de système nerveux central, le mésoderme continue à se découper en somites, en pièces intermédiaires et en lames latérales creusées du cœlome. Par le jeu des replis céphalique, caudal et latéraux, l'embryon s'isole des annexes auxquelles il n'est plus relié que par le cordon ombilical contenant les pédicules vitellin et allantoïdien. Le tube digestif a achevé de se refermer ventralement.

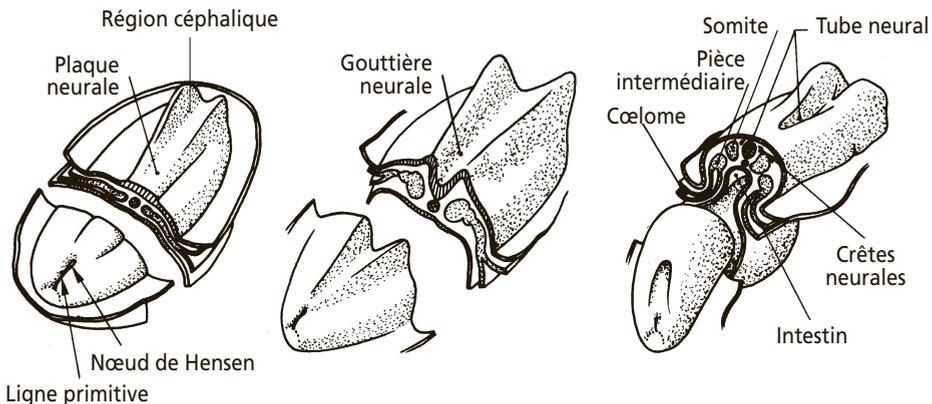


Figure 10.5 - Trois étapes de la neurulation chez l'embryon humain.
(d'après Tuchman-Duplessis).

10.5 DÉVELOPPEMENT DE L'AMNIOS ET DE LA VÉSICULE VITELLINE

Chez les Mammifères supérieurs aux œufs dépourvus de réserves, les annexes embryonnaires permettent l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine ou **nidation**, ce qui est indispensable à la survie et aux échanges. Ces annexes vont se développer avant la gastrulation ou en même temps.

10.5.1 Formation de l'amnios

On distingue 3 modalités de formation de l'amnios :

- Par **plissement**, ce qui rappelle les Oiseaux.
- Par **cavitation**, c'est le cas des Primates.
- Par **cyste ectochorial**, mode propre aux Rongeurs et qui ne sera pas étudié ici.

a) l'amniogenèse par plissement (fig. 10.3A)

Elle se rencontre chez les Carnivores, les Ongulés, les Lagomorphes (lapins) et chez les Primates primitifs (Lémuriens).

Les cellules trophoblastiques de la couche enveloppante qui recouvraient le bouton embryonnaire disparaissent par exfoliation, de telle façon que les cellules de celui-ci affleurent à la surface de l'embryon. Comme chez les Oiseaux, il se forme à la périphérie du bouton embryonnaire des replis qui vont à la rencontre l'un de l'autre tandis que le bouton s'enfoncé dans le blastocyste. Les replis se soudent et délimitent une cavité amniotique.

b) l'amniogenèse par cavitation (fig. 10.3B, C)

On l'observe chez les Insectivores (hérisson, musaraigne), les Chiroptères (chauve-souris) et chez les Primates (singes, homme).

Le trophoblaste s'étale sur toute la surface externe de l'embryon, y compris le bouton embryonnaire. Entre la zone la plus externe cytotrophoblastique et l'épiblaste du bouton embryonnaire, des vacuoles se forment, confluent et donnent une cavité amniotique, vers le 8^e jour chez la femme.

Le mésoderme extra-embryonnaire, sous la forme d'un mésenchyme, tapisse le trophoblaste. On ignore s'il provient de la délamination du cytotrophoblaste ou de l'entoblaste. Ce mésenchyme se condense en une lame externe appliquée contre le cytotrophoblaste : la somatopleure extra-embryonnaire, et une lame interne appliquée contre l'entoblaste qui délimite le lécithocèle : la splanchnopleure extra-embryonnaire. Ces deux feuilletts se confondent au niveau du **pédicule embryonnaire**. Le cœlome extra-embryonnaire est la cavité délimitée par les feuilletts mésodermiques.

10.5.2 Formation de la vésicule vitelline

Pendant ou avant l'amniogenèse, le trophoblaste va se trouver entièrement doublé intérieurement par la prolifération de l'entoblaste puis du mésoderme. L'organisation de la vésicule vitelline ou lécithocèle secondaire est alors comparable à une petite

vésicule vitelline d'oiseau ne contenant pas de vitellus. On peut considérer que cette annexe est une réminiscence des ancêtres reptiliens. Elle est d'ailleurs réduite chez les Mammifères supérieurs et notamment chez l'homme. C'est un sac contenant du liquide physiologique. La vésicule vitelline a sans doute un rôle respiratoire à l'origine, ce qui explique l'importante circulation sanguine dans les premiers stades ; c'est d'ailleurs dans la splanchnopleure extra-embryonnaire qui double la vésicule vitelline que se constituent les premiers éléments sanguins, comme chez les Oiseaux.

10.5.3 L'embryon à la fin de l'amniogenèse

Lorsque le trophoblaste est doublé de la somatopleure extra-embryonnaire, le chorion est formé. Il correspond à la séreuse des Oiseaux qui s'applique sous la coquille. Ici, le **chorion** s'applique contre la muqueuse utérine, en épouse les cryptes et en digère plus ou moins profondément la paroi, suivant le type de placentation.

À la fin de l'amniogenèse, l'embryon se trouve au stade de la **ligne primitive**. L'intestin est encore largement ouvert sur la vésicule vitelline mais déjà une évagination de l'endoderme repousse les tissus mésodermiques, c'est l'ébauche de la **vésicule allantoïdienne** qui reste réduite chez l'homme.

10.6 ÉVOLUTION DES ANNEXES EMBRYONNAIRES ET FORMATION DU PLACENTA

10.6.1 Évolution de l'amnios

Établi par plissement ou par cavitation, il délimite une cavité où baigne l'embryon, emplit d'un liquide riche en fructose et en hormones comme l'œstradiol et qui atteint chez l'homme une contenance de 1 à 1,8 litres à la naissance. L'emploi d'isotopes radioactifs permet de montrer que ce liquide est continuellement absorbé par l'embryon par voie buccale et évacué vers l'allantoïde par les reins.

À mesure que se développe l'amnios, le cœlome extra-embryonnaire se réduit et l'amnios s'accrole au chorion sur une étendue de plus en plus grande (fig. 10.6).

10.6.2 Évolution de la vésicule vitelline

C'est une formation de caractère primitif ; importante chez les Oiseaux et les Reptiles. Elle est encore bien développée chez les Marsupiaux où elle est en contact avec le chorion. Elle est très vascularisée et la circulation vitelline apporte alors des substances nutritives au fœtus. Le placenta à vascularisation vitelline est un **omphalo-placenta (placentation vitello-chorionique)**.

La vésicule vitelline, chez les Carnivores, subsiste pendant toute la gestation, mais n'entre pas en contact avec le chorion. Chez les Ruminants, elle régresse précocement. Chez l'Homme, c'est une poche qui reste très réduite (fig. 10.6), elle a sans doute un rôle respiratoire au début du développement, en raison de son importante circulation sanguine.

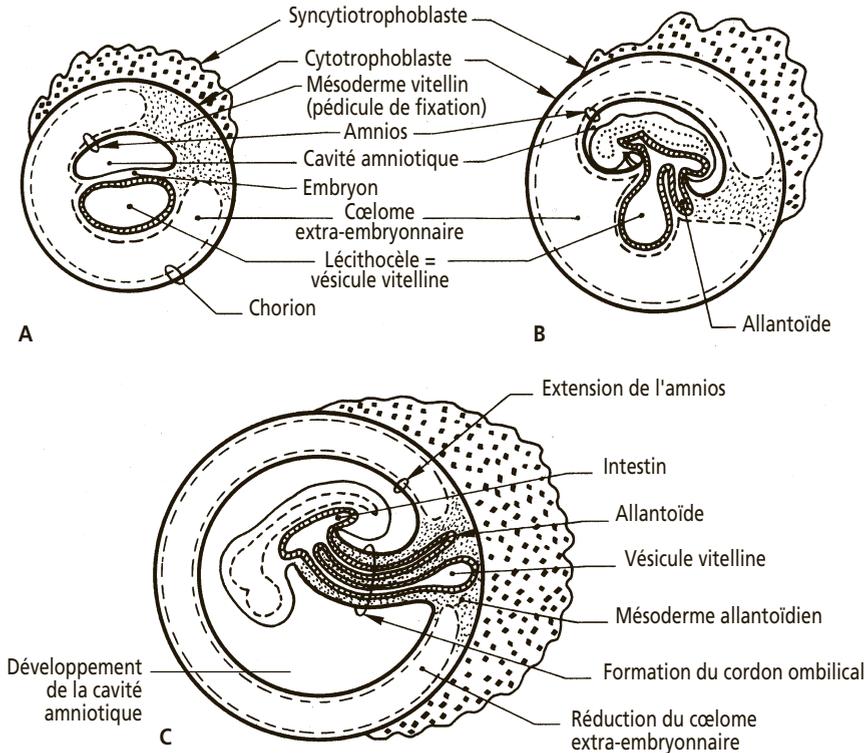


Figure 10.6 - Formation des annexes embryonnaires chez un embryon de Mammifère (homme).

A : 2 à 3 semaines; B : 4 semaines; C : 8 semaines.

10.6.3 Évolution de l'allantoïde

Cette formation est l'homologue de celle des Oiseaux. Son importance relative par rapport à la vésicule vitelline varie avec les espèces. Chez les Monotrèmes il n'y a pas de relation avec le chorion et pas de rôle respiratoire. Chez les Marsupiaux, l'allantoïde est d'importance égale ou inférieure à la vésicule vitelline. Chez les Carnivores, elle est très développée. Chez les Primates, elle régresse très tôt. Dans l'espèce humaine (fig. 10.6), son développement atteint son maximum au bout de 2 à 3 semaines de gestation, puis il y aura oblitération. Dans tous les cas se développent dans sa paroi splanchnopleurale, des vaisseaux allantoïdiens qui vont coloniser le chorion et le vasculariser. La participation de l'allantoïde à la formation du placenta constitue une caractéristique des Mammifères placentaires (**placentation allanto-chorionique**).

10.6.4 Développement du placenta

A la nidation, l'embryon s'implante au stade blastocyste dans la muqueuse utérine hypertrophiée et très vascularisée. Il a été vu (chap. 3) que cet état résulte de l'action préparatoire des œstrogènes élaborés dans le follicule ovarien. Il est maintenu pendant

la grossesse sous l'action de la progestérone sécrétée par le corps jaune. Cette muqueuse utérine forme la **partie maternelle du placenta**.

L'embryon s'implante par son pôle embryonnaire. Les cellules du **trophectoderme** prolifèrent. La partie la plus externe devient syncytiale, formant le **syncytiotrophoblaste** (fig. 10.2a,b). Il s'enfonce dans la muqueuse utérine, par digestion plus ou moins poussée des tissus maternels, suivant le type de placenta. Chez la femme, la pénétration de l'embryon à l'intérieur de la muqueuse utérine est totale au 13^e jour de gestation.

Le trophoblaste est doublé par la somatopleure extra-embryonnaire, l'ensemble formant le **chorion** qui constitue la **partie fœtale du placenta**. Le chorion développe des villosités vascularisées sur toute sa surface. C'est le **chorion villositéux**. Plus tard, ces villosités ne se développeront plus que dans des régions déterminées qui dépendent du type de placentation. La vascularisation placentaire est celle qui s'est développée dans la splanchnopleure de la vésicule vitelline, ou celle de l'allantoïde (voir *supra*) ; ces annexes assuraient les échanges maternels au début du développement. Chez les Primates et les Rongeurs, le chorion assure toutes les fonctions placentaires alors que le sac allantoïdien est vestigial ou a disparu. Les vaisseaux allantoïdiens constituent une partie essentielle de l'allantoïde vestigiale et ce sont eux qui irriguent le chorion. Le placenta est donc fondamentalement allanto-chorionique, même si le sac allantoïdien est resté insignifiant.

Le chorion est doublé intérieurement par les parois des annexes. Suivant les régions, et avec une plus ou moins grande extension suivant les espèces, cette doublure est soit le feuillet ecto-mésodermique de l'amnios, soit le feuillet endomésodermique de l'allantoïde. La formation à 4 feuillets qui en résulte est dans le premier cas un **amnio-chorion**, dans le second un **allanto-chorion**.

10.7 RAPPORTS ENTRE LES PARTIES MATERNELLES ET EMBRYONNAIRES DU PLACENTA

Ils sont variables suivant les espèces¹.

10.7.1 Placentas indéciduels (fig. 10.7A, B)

L'implantation de l'embryon n'entraîne aucune lésion vasculaire au niveau des tissus utérins et l'expulsion du placenta se fait sans hémorragie. L'épithélium utérin demeure intact pour tout ou partie, et se trouve accolé au trophoblaste embryonnaire. On distingue généralement deux degrés :

a) Type épithélio-chorial (ex. : porc, cheval, Cétacés)

Les villosités choriales nombreuses et développées s'insèrent entre les digitations de la muqueuse utérine. C'est un **placenta diffus** parce que les villosités s'étendent sur toute la surface du trophoblaste.

1. La classification présentée est assez artificielle et dans chaque groupe des variations d'une espèce à l'autre sont relevées. D'autre part le type conjonctivo-chorial est contestable, les observations en microscopie électronique montrent qu'une structure épithéliale maternelle discontinue subsiste ; il devrait être considéré comme épithélio-chorial.

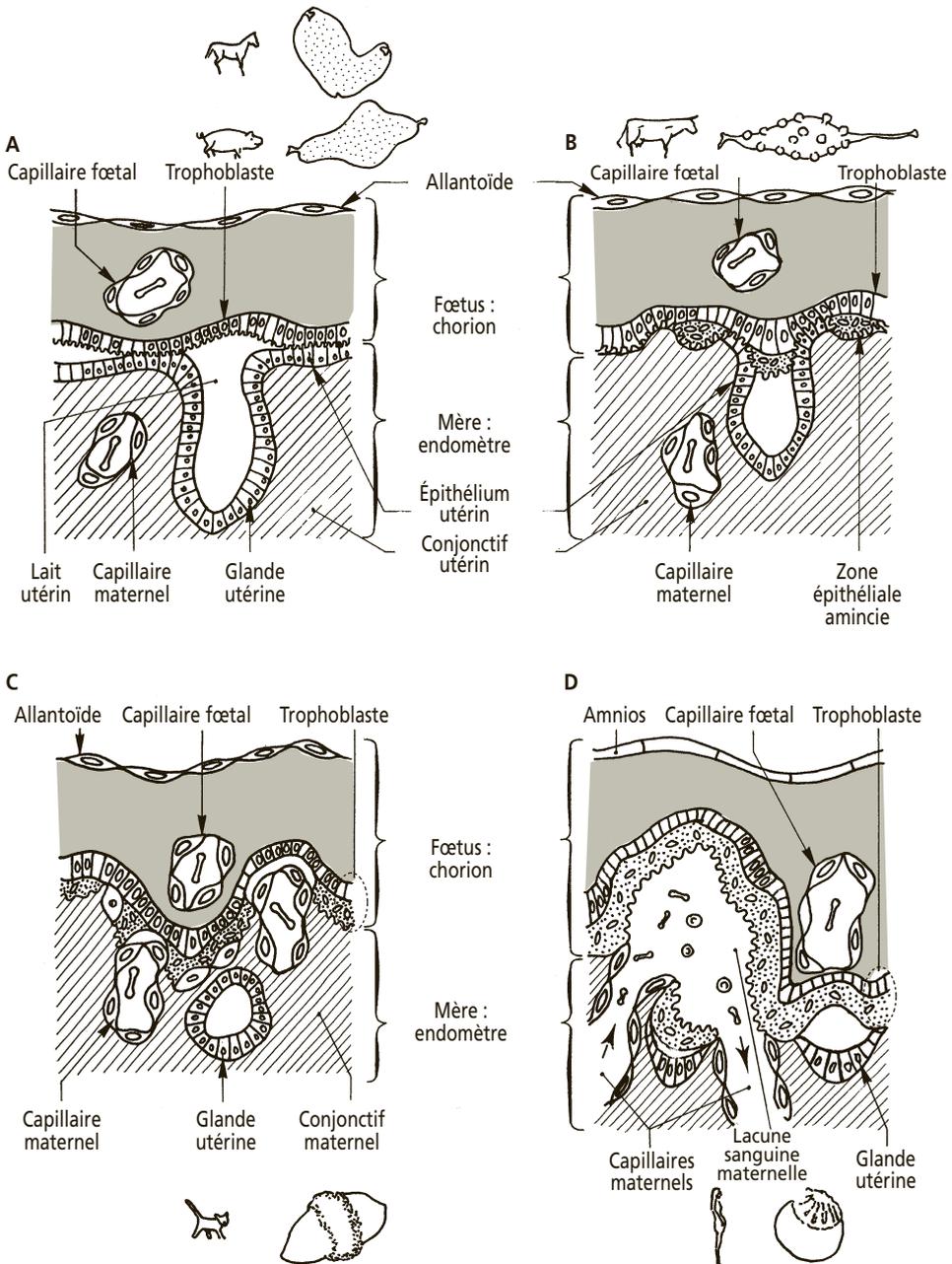


Figure 10.7 - Principaux types de placentation chez les Mammifères.

A-B : Placentation indécidué. **A** : épithélio-choriale (placenta diffus). **B** : conjunctivo-chorial (placenta cotylédonaire). **C-D** : Placentation décidué. **C** : endothélio-choriale (placenta zonaire) **D** : hémio-choriale (placenta discoidal).

b) Type conjonctivo-chorial (ex. : Ruminants)

Dans ce type de placenta encore parfois désigné sous le terme de syndesmochorial, l'épithélium maternel est corrodé et devient discontinu. Les échanges sont plus intimes : cinq couches cellulaires seulement séparent le sang fœtal du sang maternel. Les villosités sont localisées au niveau de plages ou **cotylédons**. C'est un **placenta cotylédonaire**.

10.7.2 Placentas déciduals (fig. 10.7C, D)

Le trophoblaste pénètre profondément dans la muqueuse utérine, une partie de l'endomètre est détruite ou rejetée lors de la parturition. C'est la **décidue** ou **caduque**. Elle s'accompagne d'hémorragie. On distingue, là encore, deux degrés :

a) Type endothélio-chorial (ex. : Carnivores)

Au niveau de l'endomètre, l'épithélium a disparu et le conjonctif a en partie été résorbé. Il ne subsiste que l'endothélium des capillaires formant barrière entre le trophoblaste et le sang maternel. Il y a hémorragie à la parturition. Les villosités sont réparties en une ceinture autour du sac embryonnaire. C'est un **placenta zonaire**.

b) Type hémio-chorial (ex. : Rongeurs, Insectivores, Primates)

Les villosités choriales détruisent les parois des capillaires maternels. Il se forme des lacunes sanguines dans lesquelles elles baignent directement. Les villosités ne subsistent qu'en une aire discoïdale. C'est un **placenta discoïdal**.

10.7.3 Physiologie du placenta

a) Le placenta est une zone d'échanges materno-fœtaux

L'intensité des échanges s'accroît avec la diminution de l'épaisseur des barrières placentaires. Les échanges sont donc plus importants dans les placentations déciduals.

D'autre part, comme la barrière placentaire s'amincit au cours de la grossesse, ce n'est qu'à partir d'un certain stade (4^e mois chez la femme) que se trouve acquise la structure la plus favorable pour les échanges.

La barrière placentaire présente une perméabilité sélective, et les échanges se font non seulement par diffusion mais surtout par transfert actif. De la mère vers l'enfant peuvent passer oxygène, eau, sels, protéines, glucides, lipides, hormones vitamines, anticorps, certains médicaments et de nombreux virus. Le fœtus élimine CO₂, eau et urée, des déchets et des hormones.

b) Le placenta est aussi un organe endocrine

Les hormones placentaires contrôlent la grossesse en conjugaison avec les hormones ovariennes et hypophysaires. Le site d'élaboration des hormones est essentiellement le syncytiotrophoblaste. Une **gonadotrophine chorionique** apparaît rapidement après la nidation. L'**hormone lactogène placentaire** a une activité analogue à celle de l'hormone de croissance hypophysaire ; des **hormones œstrogènes** et de la **progestérone** augmentent régulièrement jusqu'à la fin de la grossesse (voir § 2.5.1 et 3.2.2).

Questions

- 10.1 De quelles structures l'ovocyte d'un mammifère est-il entouré lors de la ponte ovulaire ?
- 10.2 Que désigne-t-on sous le terme de compaction ?
- 10.3 Quelles sont les structures constituant un blastocyste primaire ?
- 10.4 À quel stade du développement la nidation se réalise-t-elle ?
- 10.5 Quel est le phénomène qui intervient entre les stades embryonnaires didermique et tridermique ?
- 10.6 Existe-t-il une vésicule vitelline chez les Mammifères ?
- 10.7 Qu'est-ce qui constitue la partie fœtale du placenta ?
- 10.8 Qu'appelle-t-on placenta indécidué ?
- 10.9 Quels sont les différents types d'amniogenèse et dans quels taxons les observe-t-on ?
- 10.10 Quel type de placentation observe-t-on chez les Primates ?

Réponses page 387

PARTIE 3

MÉCANISMES DE LA MORPHOGENÈSE

- *Contrôle génétique du développement*

L'œuf fécondé est, dans la majorité des cas, une cellule polarisée et porteuse d'informations maternelles sous forme d'ARN stables et de protéines régulatrices de l'expression des gènes, répartis selon des gradients. Cette topographie moléculaire et sa traduction dans le plan d'organisation de l'embryon sont particulièrement bien connues chez la drosophile. L'étude préliminaire du contrôle génétique du développement de cet Insecte se révélera indispensable lorsqu'on apprendra que les gènes régulateurs du développement des Vertébrés programment le développement de l'embryon suivant des règles analogues.

- *Analyse de la segmentation*

Au cours de la segmentation qui partage le cytoplasme hétérogène de l'œuf entre les blastomères, les noyaux fils se trouvent dans des cellules équipées de protéines régulatrices différentes. Celles-ci activent des gènes suivant un programme qui est fonction de la position de la cellule dans la blastula ; s'il s'agit d'Insectes, le programme est lié à la position du noyau dans le syncytium. Cellules et noyaux reçoivent ainsi des informations de position, en relation avec leur localisation sur les axes antéro-postérieur et dorso-ventral de l'organisme en formation. Une spécialisation croissante des différents territoires embryonnaires en résulte ; rapidement chaque partie

de l'embryon deviendra un composant indispensable du futur organisme, trop spécialisé pour que son ablation puisse être compensée par une partie voisine. Cette spécialisation est stricte chez les embryons à développement en mosaïque et chez les embryons d'Insectes qui restent dans un premier temps à l'état syncytial ; elle est plus souple et plus progressive dans les développements à régulations.

- *Mouvements morphogénétiques*

Après un certain nombre de cycles mitotiques, la taille des cellules est proche de celle des cellules somatiques. Des mouvements morphogénétiques coordonnés s'amorcent et durent pendant toute l'embryogenèse. Des modifications du cytosquelette permettent aux cellules de migrer sur un substrat de matrice extracellulaire contenant notamment de la fibronectine. Les migrations alternent avec des adhérences intercellulaires spécifiques assurées par le jeu complexe d'une gamme de molécules d'adhérence cellulaire.

- *Mort cellulaire programmée ou apoptose*

La disparition de certains tissus ou de certains organes au cours du développement embryonnaire est une composante normale de la morphogenèse. C'est l'apoptose qui est programmée génétiquement. Elle est souvent nécessaire pour l'acquisition de la forme définitive et de l'état fonctionnel des organes. Chez les animaux à métamorphose, dont l'organisme est l'objet d'un ou plusieurs remaniements cellulaires, des apoptoses programmées de grande ampleur se produisent aussi après la naissance.

- *Inductions embryonnaires pendant la gastrulation et la morphogenèse*

Pendant un développement à régulations, les territoires embryonnaires peuvent exercer l'un sur l'autre une influence qui détermine l'apparition de spécialisations territoriales nouvelles : c'est le cas des inductions du mésoderme par des molécules issues de l'endoderme, dans la blastula d'Amphibiens, puis de l'induction neurale par des facteurs mésodermiques pendant la gastrulation et finalement des inductions qui se succèdent dans la différenciation d'un organe, comme l'œil.

- *Expression du génome embryonnaire*

Les protéines synthétisées au début de la segmentation sont toujours la traduction d'ARN-m accumulés dans l'ovocyte. Le génome embryonnaire transcrit, plus ou moins tôt suivant les espèces, des ARN-m nouveaux qui prennent le relais des ARN maternels. Les inductions provoquent la transcription d'ARN-m exprimant des gènes régulateurs, puis des gènes spécifiques de tissus.

- *Différenciation des gonades et différenciation sexuelle.*

 - Médiation hormonale. Déterminisme génétique*

La différenciation des gonades fournit un modèle d'organogenèse où les relations cellulaires sont différentes. Cette différenciation est le résultat d'actions hormonales, mais la différenciation des cellules sécrétrices de ces hormones nécessite l'intervention d'une série de gènes portés en particulier par les chromosomes sexuels et que l'on commence à identifier.

CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT

11

PLAN

- 11.1. Les facteurs de transcription et les protéines inductrices
- 11.2 Support génétique du développement précoce de l'embryon de drosophile
- 11.3 Les gènes régulateurs dans le développement des Vertébrés

Depuis longtemps, les embryologistes souhaitaient connaître la nature et le mode d'action des gènes qui contrôlent l'organisation de l'œuf, puis celle de l'embryon et finalement la position et la différenciation des organes ; ils ne possédaient pas les outils nécessaires jusqu'à ce que les travaux sur la drosophile aient apporté des connaissances nouvelles. Grâce à l'étude des mutations chez cet Insecte on a identifié des familles de gènes régulateurs du développement. On peut maintenant, avec les techniques de biologie moléculaire, et principalement celle de l'ADN recombinant, extraire, isoler et reproduire en de nombreuses copies les gènes qu'on désire étudier. Nous avons vu dans le chapitre 3, le rôle joué par les gènes de polarité. D'autres familles de gènes interviennent ensuite pendant la segmentation, et notamment les gènes sélecteurs homéotiques. Leur intérêt, cantonné d'abord à la drosophile, s'est considérablement accru après qu'on eut découvert qu'il existe chez d'autres Invertébrés et chez les Vertébrés un système de gènes régulateurs présentant dans leurs séquences un degré élevé d'homologies avec ceux de la drosophile et exerçant des fonctions régulatrices tout à fait comparables. Chez les Vertébrés, certains de ces gènes commencent à s'exprimer dès la blastula, au cours de laquelle se définit la polarité céphalo-caudale ; ils contrôlent largement la mise en place des grands axes et des feuillettes tandis que d'autres s'expriment plus tardivement pour orchestrer la différenciation d'organes plus précis.

La compréhension du fonctionnement de ces gènes permet de dégager la notion de **gènes maîtres** (W. Gehring) qui, dans une morphogenèse, agissent à la manière de chefs d'orchestre, coordonnant l'activation en cascade d'autres gènes, eux-mêmes régulateurs de la différenciation d'un secteur de plus en plus restreint de l'organisme ou d'un organe, et finalement de l'activation de gènes effecteurs codant pour la synthèse de protéines constitutives des tissus et des organes.

Ces mécanismes sont communs aux Vertébrés et aux Invertébrés ; ils ont donc été mis en place depuis plus de 500 millions d'années, ce qui conduit à réviser certaines notions sur l'évolution.

11.1. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET LES PROTÉINES INDUCTRICES

L'étude des mécanismes du développement qui va suivre décrit à toutes les étapes et dans toutes les espèces l'activation de gènes du développement. Des protéines, les **facteurs de transcription**, codées par des gènes régulateurs très conservés au cours de l'évolution, stimulent ou répriment l'expression d'autres gènes parmi lesquels nous rencontrerons ceux qui codent pour les **protéines inductrices**, protéines sécrétées qui se lient à des récepteurs de cellules voisines et orientent le devenir de celles-ci. La liste de ces molécules s'allonge sans cesse et leur nomenclature se révèle difficile. Nous présenterons les molécules les plus fréquemment citées avant d'aborder l'étude du contrôle génétique du développement.

11.1.1 Les facteurs de transcription

Ce sont des protéines codées par des **gènes régulateurs** ; elles déclenchent ou répriment la transcription d'un gène. Ces facteurs de transcription possèdent des domaines de liaison à des séquences spécifiques d'ADN (promoteur ou élément amplificateur d'un gène) formant ainsi des **complexes de transcription**. L'activité d'un facteur de transcription peut elle-même être régulée par d'autres facteurs de transcription.

Les domaines de liaison à l'ADN sont formés de séquences d'acides aminés très conservées au cours de l'évolution. On peut regrouper ces facteurs en familles d'après la structure de ces domaines ; à l'intérieur d'une famille dont les membres possèdent de fortes homologues de structure, de légères différences dans la séquence des acides aminés du domaine de liaison déterminent, pour chaque facteur de transcription, la spécificité de la reconnaissance d'une séquence d'ADN.

a) Les protéines à homéodomaine

Elles résultent de l'expression de gènes, désignés sous le terme d'**homéogènes**, qui possèdent une séquence particulière, l'**homéoboîte** (ou « **homeobox** » en anglais). Celle-ci code pour un site de liaison à l'ADN appelé **homéodomaine**, de 60 acides aminés environ. Outre les produits des gènes homéotiques (gènes *Hox*), de nombreux facteurs de transcription contiennent un homéodomaine. D'abord reconnues chez la drosophile, des protéines de ce type ont été trouvées dans tous les groupes zoologiques. Elles sont étudiées à propos du développement de la drosophile (§ 11.2.4). Nous indiquons ici celles que nous retrouvons à toutes les étapes du développement des Vertébrés (voir § 11.3).

- La **β -caténine**, protéine à fonctions multiples, peut s'associer à d'autres facteurs de transcription et modifier éventuellement leurs propriétés. Elle s'associe par exemple à des facteurs TCF pour activer des gènes spécifiques comme *siamois*, *Xnr3* et *cerberus* chez le xénope (voir § 12.5.7).
- Les protéines codées par *Pitx1* et *Pitx 2*, *Otx1* et *Otx2*, gènes de la famille Bicoïd décrits à propos de la drosophile (voir § 3.5.4b). Leurs gènes sont activés pendant le développement du cerveau antérieur des Vertébrés (voir § 11.3.5 a).

- La protéine codée par *goosecoïd*, proche des gènes *gooseberry* et *bicoïd* de la drosophile et dont le nom résulte d'ailleurs de la contraction de ces derniers. Goosecoïd s'exprime dans le futur organisateur de Spemann et Mangold et dans le nœud de Hensen (voir § 12.5.8d et 15.3.2).
- La protéine codée par *siamois* est active dans l'organisateur de Spemann où elle a une activité dorsalisante. Le gène ne s'exprime qu'après la transition blastulécienne. Le gène *twin* a des fonctions voisines (voir § 12.5.8a).
- Les protéines codées par les gènes *vent1* et *vent2* sont présentes dans le mésoderme ventral para-axial et latéral.
- Les protéines codées par les gènes *mx* et *Sox* ; *mx1* et *Sox7*, par exemple, sont présentes dans l'endoderme.
- Les protéines codées par *lim* qui possèdent, outre l'homéodomaine, deux autres domaines de liaison à l'ADN. Lim participe notamment à l'organisation de la tête (voir § 11.3.5).
- La famille de protéines codées par les gènes **Pax** qui possèdent une séquence homologue dans les gènes de segmentation « paired » de la drosophile. Cette homologie est à l'origine du nom donné à ces gènes (Pax pour « paired box », Noll et coll., 1986). Cette séquence code pour un domaine de 128 acides aminés appelé « paired » qui constitue au niveau des produits un site de liaison à l'ADN. De nombreuses protéines Pax comportent en plus un homéodomaine (voir § 11.3.5b).

b) Les facteurs de transcription avec des domaines de liaison à l'ADN autres que l'homéodomaine

- *Les protéines codées par des gènes apparentés à Brachyury.* Ce nom est tiré de l'observation d'une mutation du gène *T'* chez la souris qui provoque un développement anormal du mésoderme axial postérieur notamment au niveau de la queue ; chez le xénope, on emploie l'abréviation *Xbra*. Les facteurs de transcription appartenant à cette famille possèdent un domaine de liaison semblable à celui de *T'* et sont désignés par l'abréviation **Tbx** (pour « Tbox ») (voir § 15.3.4).

On peut citer le déterminant endodermique **VegT**, synthétisé dès le début de l'ovogenèse (voir § 12.5.5) et les facteurs *Tbx4* et *Tbx5* déterminant les caractéristiques propres aux membres antérieurs et postérieurs (voir § 11.3.4b).

- *Les produits codés par les gènes smad* sont des protéines cytoplasmiques de 50 kDa qui sont phosphorylées à la suite d'une liaison d'un TGF- β (voir plus loin) avec son récepteur sérine-thréonine kinase. Smad migre alors vers le noyau où elle se lie à un gène cible dont elle régule l'activité. Smad 1, 5 et 8 sont par exemple phosphorylées quand une protéine BMP se lie à son récepteur (voir § 11.1.2a).
- *Les facteurs TCF* ont été identifiés chez la souris, l'homme et des amphibiens. Ils diffèrent des précédents en ce qu'ils sont des facteurs architecturaux sans domaine d'activation ou de répression spécifique. Ils se lient à l'ADN, mettant en contact des sites régulateurs et des complexes de transcription. Tcf3 par exemple contient des domaines de liaison avec la β -caténine et un domaine HMG (pour « High Mobility Group ») qui reconnaît une séquence consensus d'ADN dans la

séquence régulatrice des gènes cibles. On leur connaît une double fonction pendant la gastrulation : ils répriment la transcription de *siamois* sur la face ventrale d'une gastrula, mais l'activent en présence de β -caténine dans la région dorsale.

• *Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, aux hormones stéroïdiennes et à l'acide rétinoïque* sont des récepteurs nucléaires. Les protéines de cette famille possèdent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation de la transcription. Elles interviennent dans différentes étapes de la morphogénèse.



L'acide rétinoïque est élaboré par l'embryon, c'est un produit d'oxydation du rétinol ou vitamine A. Cette vitamine apportée par l'alimentation maternelle est indispensable pour un développement normal de l'embryon. Son déficit ou son excès provoquent des graves malformations. L'acide rétinoïque est liposoluble et traverse la membrane plasmique sans passer par un récepteur membranaire. Il se lie dans les cellules cibles à des récepteurs nucléaires spécifiques (RARs) et forme des complexes qui, à la manière des hormones stéroïdes, pénètrent dans le noyau et se lient à des séquences d'ADN. Il existe plusieurs formes de molécules réceptrices à l'acide rétinoïque dont chacune possède des variantes. Son action n'est donc pas uniforme car elle peut être modulée par la variété des récepteurs. Les **combinaisons « Acide rétinoïque/RAR »** remplissent ainsi la fonction de facteurs de transcription en régulant l'activité des gènes cibles. Les cellules ne possédant pas ces récepteurs sont insensibles à l'acide rétinoïque.

11.1.2 Les protéines inductrices

Les protéines inductrices sont souvent synthétisées dès l'ovogénèse. Elles deviennent actives dès la segmentation, au cours des inductions et des déterminations des territoires embryonnaires. Elles sont, à quelques exceptions près (voir *infra*, f) sécrétées dans le milieu extra-cellulaire et sont des agents de communication cellulaire à courte distance (**facteurs paracrines**). Beaucoup de ces protéines ont été identifiées dans de nombreux groupes zoologiques (voir Méthodes, encart 11.1).



Les modalités suivant lesquelles les informations portées par ces molécules inductrices sont transmises à des cellules cibles sont désignées sous le terme de **transduction des signaux** : ces protéines inductrices se lient à des récepteurs spécifiques intégrés dans leur membrane cytoplasmique et déclenchent ainsi une série de réactions intracellulaires aboutissant à l'activation ou à la répression d'un gène. Les modes de transduction sont décrits pour chacun des différents inducteurs.

a) Les facteurs de croissance transformants (TGF- β pour « Transforming Growth Factor β »)

Ces protéines constituent une super-famille moléculaire d'environ trente membres. Ce sont des protéines sécrétées vers des cellules cibles proches, sous la forme de précurseurs de poids moléculaire plus élevé ; ils doivent subir une maturation pour être actifs. Les premiers facteurs identifiés qui ont donné leur nom au groupe étaient des agents mitogènes sécrétés par des cellules transformées. On les retrouve dans toutes les cellules.



Quelques méthodes expérimentales utilisées pour identifier des molécules inductrices

Nous présentons ici, sommairement, quelques-unes des méthodes les plus fréquemment utilisées dans les travaux destinés à tester l'activité inductrice d'une protéine. La plupart de celles qui sont citées ont été utilisées sur le modèle Amphibien, mais certaines sont également applicables à d'autres modèles expérimentaux (souris, drosophile...).

- **Culture d'explants** : on cultive, en présence d'un inducteur potentiel de structures neurales ou mésodermiques, des calottes animales de xénope prélevées à la mi-blastula et qui ont donc encore une compétence étendue. On recherchera ensuite dans l'explant des différenciations de structures mésodermiques ou ectodermiques ou des produits de l'expression de gènes caractéristiques pour identifier la nature de l'inducteur recherché (par exemple, N-CAM pour du tissu nerveux, actine pour du muscle, etc.) Les types de différenciations obtenues peuvent d'ailleurs varier en fonction des concentrations employées et de l'âge de l'explant, d'où la nécessité de maîtriser avec soin ces deux paramètres.

La méthode de **culture en sandwich**, mise au point par Holtfreter sur des tissus d'Amphibiens est une variante de la précédente : le fragment de tissu inducteur à tester est placé à l'intérieur d'un explant prélevé sur la cape apicale et replié sur lui-même.

Les cultures de cellules dissociées n'aboutissent pas obligatoirement aux mêmes résultats ; elles introduisent un nouveau paramètre en supprimant des interactions cellulaires (voir § 15.5.2).

- **Injection d'ARN-m codant pour la protéine testée** : les ARN-m codant pour un inducteur éventuel sont injectés dans un blastomère où ils seront traduits. Dans l'aire ventro-végétative d'une morula, le caractère d'inducteur dorsalisant de la protéine synthétisée sera démontré par la différenciation en position ectopique d'un axe dorsal surnuméraire complet, ou seulement partiel, la partie céphalique ou troncale faisant défaut, suivant la nature de l'inducteur.

- **Recherche du site d'expression d'un gène régulateur** : l'emploi de sonde d'ADNc permet cette recherche. On isole les ARN-m transcrits dans le centre organisateur ou dans toute autre région de l'embryon, suivant la nature de l'expérience. Des ADNc sont obtenus avec la technique des transcriptases inverses ; les banques d'ADN ainsi obtenues sont triées à l'aide d'homéoboîtes de gènes régulateurs connus chez la drosophile ou chez les Vertébrés. On retient les ADNc possédant ces mêmes séquences. Il est alors possible, en les liant à un marqueur fluorescent, d'en faire des sondes à l'aide desquelles on peut repérer par hybridation moléculaire *in situ* tout ARN-m porteur de la même séquence et, après l'avoir isolé, entreprendre son identification.

- **Techniques de transgénèse** : elles permettent d'évaluer le rôle d'un gène; elles consistent à provoquer une mutation chez l'embryon en modifiant le fonctionnement d'un gène déterminé suivant des techniques de génie génétique qu'on n'abordera pas et à déduire par ses effets le fonctionnement du gène normal. Les mutations « **knock-out** » consistent à rendre inactif un gène particulier sélectionné pour son rôle présumé à un stade du développement. L'analyse des anomalies observées à la suite du traitement permet de connaître le rôle de ce gène.

 ENCART 11.1 (suite)

Les mutations « **dominantes négatives** » produisent la transcription d'un ARN-m défectueux ; il est traduit en une protéine qui perturbe le fonctionnement cellulaire et le développement, ce qui permet, par comparaison avec les conditions normales d'apprécier le rôle du gène sauvage. C'est le cas, par exemple, d'un facteur de transcription privé par mutation de son domaine de liaison à l'ADN ; s'il est surexprimé par transfection chez un embryon expérimental, il entre en compétition avec le facteur de transcription normal et perturbe la fonction régulatrice de celui-ci.

- **Les ARN antisens** : cette méthode consiste à introduire un ARN-m ou des oligonucléotides synthétisés *in vitro* à partir d'un gène cloné et qui sont une version inversée d'un ARN-m qu'on veut neutraliser. Il formera un hybride avec l'ARN normal qui sera ainsi neutralisé. On pourra alors apprécier les effets de la suppression de l'expression du gène sur le développement.

- **Modification agissant sur le fonctionnement des récepteurs** : on citera deux démarches.

Modification de la nature d'un récepteur : le rôle des FGF et des TGF- β peut être démontré en agissant sur le fonctionnement de leurs récepteurs (voir fig. 11.A). Ces récepteurs membranaires sont des dimères. Une mutation est provoquée expérimentalement de telle manière que les ARN-m codant pour ces récepteurs élaborent une protéine dépourvue de son domaine cytoplasmique à activité tyrosine-kinase. Par exemple des ARN-m mutés sont injectés en excès à l'embryon expérimental, des molécules tronquées sont alors synthétisées en quantité et entrent en compétition avec les molécules normales. La probabilité pour que les dimères formés à la surface de ses cellules comportent une forme tronquée est élevée, les récepteurs ne seront pas fonctionnels. Les embryons ainsi traités présenteront donc des anomalies au niveau des structures que le FGF ou le TGF- β était supposé induire. La nature de la déficience renseigne sur les potentialités inductrices de la protéine.

Compétition au niveau d'un récepteur : on peut également établir une compétition d'une autre nature au niveau d'un récepteur avec pour conséquence l'apparition de dysfonctionnements dans le développement. Ainsi, le rôle inducteur des protéines Wnt est par exemple étudié en utilisant une compétition entre son récepteur membranaire Frizzled et la protéine soluble Frizbee dont on peut induire la synthèse en excès par injection de son ARN-m. Frizbee se lie avec la même efficacité à Wnt mais, n'étant pas transductrice de signaux, elle neutralise ses effets. On pourra alors analyser les déficiences qui en résultent.

- *Molécules appartenant à la famille des TGF- β*

- **Les TGF- β au sens strict** sont souvent des inhibiteurs de la division cellulaire et interviennent dans la formation de la matrice extracellulaire. On les rencontre surtout plus tardivement, au cours des organogénèses.

- **Les facteurs de type activine** sont actifs dans l'induction et la différenciation du mésoderme des embryons de Vertébrés (voir 12.5.8c).

On connaissait déjà l'activine A et l'activine B chez les Mammifères adultes où elles ont des fonctions différentes de celles que nous étudierons chez les embryons. L'activine A, protéine de 24kDa, module notamment la libération de FSH (voir § 2.5.1

et 3.2.1c). Dans les expériences sur l'induction du mésoderme chez les Amphibiens, l'activine A est la plus efficace. Son ARN-m n'est transcrit qu'après la transition blastuléenne. L'activine A induit dans des calottes de l'hémisphère animal de blastula isolées des différenciations qui sont fonction de sa concentration ; en relation avec celle-ci, elle induit d'abord de l'épiderme, puis du mésoderme ventral (éléments sanguins), du pronéphros, des structures dorsales avec des cellules musculaires.

– **La protéine Vg1** (voir § 12.5.8b et 12.5.9b) est présente dans l'hémisphère végétatif de l'ovocyte sous une forme inactive. Elle est activée après la réaction corticale, surtout dans la région dorsale, par une protéase. Elle contribue à l'induction de structures dorsales, ses effets étant dose-dépendants ; elle agit aussi sur la différenciation de l'endoderme.

– **Les protéines Nodal**, (voir § 12.5.8d, 15.4.2a et 15.7) découvertes chez la souris dans les cellules voisines du nœud de Hensen et les protéines *Xnr*¹ voisines de Nodal, chez le xénope (*Xnr* pour « **Xenopus nodal related gene** »). Ces protéines sont présentes dans l'endoderme de la blastula suivant un gradient de concentration maximum dans la région du centre de Nieuwkoop. La régulation de l'expression de Nodal permet de contrôler la formation du mésoderme dorsal et ventral et, plus tard, l'asymétrie droite-gauche. Cette régulation s'exerce par des inhibiteurs, produits des gènes inhibiteurs des familles *lefty* et *cerberus*.

– **Les protéines BMP** (pour « **Bone Morphogenetic Proteins** ») ont d'abord été reconnues comme des facteurs capables de provoquer des différenciations osseuses et cartilagineuses. Ces protéines et leurs homologues, sont très conservés au cours de l'évolution. Elles jouent très tôt un rôle dans l'établissement du plan d'organisation dorso-ventrale de l'embryon, aussi bien chez un Insecte comme la drosophile (**protéine Decapentaplegic** ou **Dpp**) que chez un Vertébré comme la grenouille (voir § 15.4.1 ; encart 15.6). On les retrouve dans l'établissement des plans d'organisation de différentes ébauches où elles régulent la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires.

On a actuellement identifié une vingtaine de protéines BMP synthétisées sous la forme de précurseurs de 396 à 513 acides aminés. Les récepteurs membranaires de ces protéines comportent deux sérine/thréonine-kinases, comme ceux des TGF- β , plus un protéoglycane. Le mode de transduction des signaux qu'émettent les BMP liées à leurs récepteurs implique des molécules Smad spécifiques selon la nature de l'inducteur.

– **La protéine Derrière** est un TGF- β actif dans l'induction du mésoderme postérieur, après la mi-blastula ; son expression est activée par VegT (voir § 12.5.5).

• Les récepteurs membranaires des TGF- β (fig. 11.1B)

Ces protéines membranaires possèdent un domaine cytoplasmique à activité sérine/thréonine-kinase. Ces récepteurs se combinent aux facteurs sous la forme de dimères dont l'un des éléments est commun à de nombreux facteurs et l'autre spécifique d'un ou de quelques facteurs donnés. Ils s'autophosphorylent après activation ;

1. Par convention, la dénomination d'une protéine régulatrice et de son gène débute par X lorsqu'elle a été identifiée chez le xénope, elle a toujours son homologue chez les autres Vertébrés, par exemple : *Xwnt* et *Wnt*, *Xnr* et *Nodal*.

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

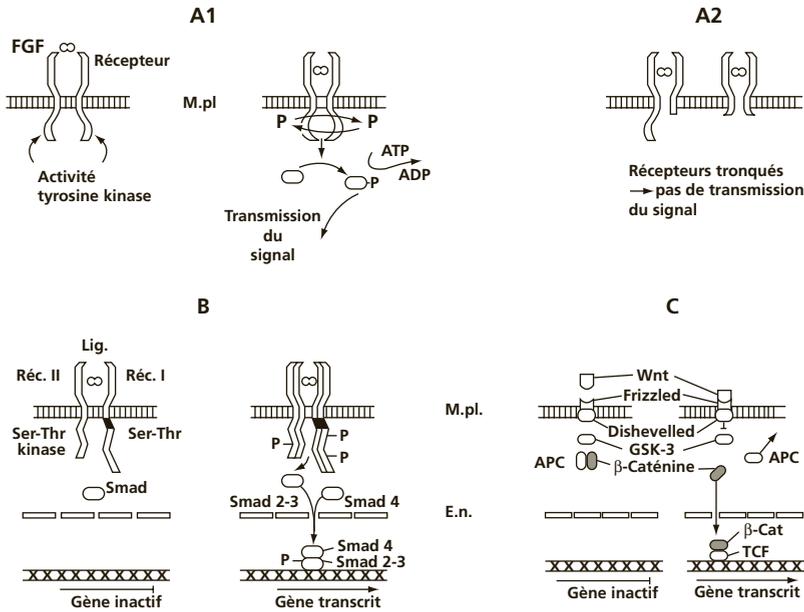


Figure 11.1 - Modèles de fonctionnement de récepteurs membranaires.

A : Schéma du fonctionnement de récepteurs aux FGF

A1 : Combinaison d'un FGF avec deux molécules de son récepteur membranaire qui forment un dimère. Leurs domaines cytoplasmiques à activité tyrosine-kinase se phosphorylent mutuellement, ce qui active une chaîne de phosphorylations de protéines et la transmission du signal FGF vers un gène cible. **A2** : à la suite d'une mutation provoquée amputant la molécule du récepteur FGF de son domaine cytoplasmique à activité tyrosine-kinase, les dimères formés en présence de FGF peuvent comprendre une ou deux molécules tronquées. Les phosphorylations nécessaires à la transmission du signal ne peuvent pas avoir lieu.

B : Schéma du fonctionnement des récepteurs aux TGFβ. Il existe des récepteurs de type I (Réc. I) avec un domaine cytoplasmique Ser/Thr, et des récepteurs de type II (Réc. II), avec un domaine cytoplasmique à activité Ser/Thr-kinase. Les ligands (Lig) se combinent d'abord aux récepteurs de type II, puis l'ensemble aux récepteurs de type I, et forment des hétérodimères. Ceux-ci sont phosphorylés et déclenchent à leur tour la phosphorylation de protéines Smad. Selon la nature du TGF (Activine, BMP, etc.) différents types de protéines Smad sont impliqués. Les protéines Smad migrent vers le noyau où, associées à des protéines nucléaires, elles forment des facteurs de transcription.

C : Schéma du fonctionnement des récepteurs aux Wnt. Les récepteurs de Wnt sont des protéines membranaires Frizzled qui présentent des différences suivant le type de ligand. La liaison de Frizzled avec Wnt active une protéine cytoplasmique Dishevelled (Dsh), qui réprime l'activité d'une glyco-gène synthétase-kinase (GSK3). En l'absence de Wnt, sous l'action de GSK3, le β-caténine reste liée à un complexe protéique APC avant d'être dégradée par le protéasome. En présence de Wnt, GSK3 est inactivée par Dsh, le β-caténine est libérée, elle se combine avec un facteur de transcription (TCF) dans le noyau où celui-ci régule des transcriptions.

E.n. : enveloppe nucléaire; M.pl : membrane plasmique; Lig : ligand.

il s'en suit des phosphorylations en cascade de polypeptides cytoplasmiques, les protéines Smad ; celles-ci comme on l'a vu plus haut deviennent des facteurs de transcription. Chez le xénope, on a identifié un certain nombre de ces récepteurs qui sont transcrits abondamment dans la calotte animale de la blastula et dont les séquences en acides aminés ont été déterminées après clonage.

On peut distinguer trois groupes parmi ces récepteurs, dont les spécificités se recouvrent partiellement : les récepteurs des TGF- β au sens strict, les récepteurs de facteurs de type activine, et les récepteurs des protéines BMP.

b) Les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF pour « Fibroblast Growth Factor »)

Ces protéines sont répandues dans tout le règne animal. Elles ont d'abord été reconnues comme des agents mitogènes des fibroblastes en culture. On connaît une vingtaine de membres de cette famille. Ce sont des polypeptides de 15 à 30 kDa, très largement répandus dans les tissus embryonnaires ou adultes où ils régulent la prolifération et la migration cellulaires et certaines différenciations. Ils ont une forte affinité pour les sulfates d'héparane de la surface cellulaire. Les complexes FGF-héparanes se lient à des récepteurs associés en dimères (fig. 11.1A) qui sont des molécules transmembranaires à activité tyrosine-kinase ou sérine/thréonine-kinase; ces récepteurs ont une certaine sélectivité. Ils s'autophosphorylent et par une voie de transduction complexe qu'on ne décrit pas ici permettent la pénétration dans le noyau d'une kinase phosphorylée (**ERK** pour « **Extracellular signal Regulated Kinase** », anciennement MAP kinase). Cette kinase active finalement les gènes de différents facteurs de transcription.

Pour chaque FGF, à partir d'un même gène, les ARN-m transcrits peuvent être traduits en une grande variété d'isoformes à la suite d'épissages alternatifs (voir FGF4, FGF8 et FGF 10, § 11.3.4).

c) La famille des protéines Wnt

Ce sont des protéines qui agissent comme des facteurs de croissance (voir § 12.5.7 et 15.3.3). Ce sont des glycoprotéines riches en cystéine. On en connaît actuellement une quinzaine chez les Vertébrés et les gènes de six d'entre elles ont été séquencés chez le xénope. Elles ont été très conservées au cours de l'évolution et ont un fort degré d'homologie avec les quatre protéines Wnt connues chez la drosophile : le gène *wingless* exprime une protéine apparentée qui intervient dans l'établissement de la polarité pendant la segmentation chez la drosophile. *Integrated* est le nom d'un des homologues de ce gène chez les Vertébrés ; l'appellation Wnt résulte d'une contraction de ces deux termes. Les protéines Wnt agissent en connexion avec Hedgehog (voir *infra*) suivant un mécanisme identique chez la drosophile et les Vertébrés.

Ces protéines sécrétées ont des récepteurs transmembranaires de la famille des protéines Frizzled (récepteur Xfr7). La fixation de Wnt sur son récepteur Frizzled active une voie de transduction intracellulaire : par l'intermédiaire de Dishevelled, Frizzled réprime l'activité d'une glycogène synthétase kinase (GSK-3) et permet la libération de la β -caténine d'un complexe protéique. Celle-ci peut alors s'associer à

des facteurs de transcription de la famille TCF et pénétrer dans le noyau pour activer des gènes spécifiques (voir fig. 11.1 C).

Certains des gènes cibles de la protéine Wnt contrôlent la régionalisation du système nerveux central (voir § 15.4.2b, c).

d) La famille des protéines Hedgehog

Ces protéines sont codées par des gènes dont le premier a été identifié chez la drosophile. *Hedgehog* a été ainsi dénommé du fait que sa déficience produisait, sur la cuticule de l'insecte, des denticules à la manière des piquants de hérisson (en anglais : « hedgehog »). C'est un gène de polarité segmentaire chez la drosophile, il est exprimé au niveau des parasegments (voir § 11.2.3c).

Son récepteur membranaire, une protéine G (Patched) normalement active, est réprimé par Hedgehog. Cette répression libère l'activité d'une autre protéine membranaire (Smoothed) ; celle-ci peut alors libérer un facteur de transcription (Cubitus interruptus chez la drosophile, Gli chez les Vertébrés) qui pénètre dans le noyau et régule l'activité d'un gène cible de Hedgehog.

Chez les Vertébrés, on connaît plusieurs gènes homologues, dont *Sonic hedgehog* qui s'exprime au niveau de la corde (voir § 15.4.2e) ; le polypeptide correspondant se clive et la partie N-terminale qui est sécrétée est active. Cet inducteur intervient dans l'organisation dorso-ventrale du tube neural (voir § 15.4.2e) et aussi dans l'asymétrie droite-gauche (voir § 15.7.1 et 2), dans la polarité du tube digestif et dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur des membres (voir § 11.3.4c).

e) Les antagonistes de facteurs de croissance

Ils agissent dans le contrôle du développement en inhibant l'activité d'autres facteurs. Ils se trouvent presque exclusivement dans le centre organisateur de Spemann et Mangold ou le nœud de Hensen.

- *Cerberus* est une protéine inductrice de structures dorsales antérieures, dont les ARN-m ne sont transcrits qu'à partir de la gastrulation. Elle est un inhibiteur des facteurs Wnt, BMP, Nodal et Xnr (voir 15.4.2b).
- *Chordin* est une protéine dont la synthèse est activée par les facteurs de transcription Goosecoid et Xnot-2 peu avant la gastrulation. C'est un inhibiteur des BMPs (voir § 15.4.1b). Le couple chordin-BMP est très conservé au cours de l'évolution, et est l'homologue de Sog-Dpp de la drosophile, ces deux couples étant fonctionnels dans l'organisation dorso-ventrale de l'embryon (voir encart 15.6).
- *Dickkopf* (de l'allemand : grosse tête) se fixe sur les récepteurs de Wnt, inhibant ainsi la transmission de leur signal.
- *Frizzled* (*Frzb*) est une protéine soluble proche du récepteur membranaire de Wnt, Frizzled. Elle entre en compétition avec celui-ci et peut ainsi inhiber le signal (voir § 15.3.3).
- *Follistatine* a son gène transcrit dès l'ovogenèse ; elle est sécrétée à la gastrulation dans le mésoderme dorsal de xénope ou dans le nœud de Hensen et la ligne primitive. Elle est inductrice du système nerveux en inhibant l'action des BMPs et de l'activine (voir § 15.4.1c).

- *Noggin* est une protéine présente en faible quantité dans l'ovocyte de xénope et n'est transcrite activement qu'à partir de la mi-blastula. Elle induit la synthèse de protéines neurales ; c'est aussi un inhibiteur des BMPs (voir § 15.4.1a). Cette protéine en excès provoque une hypercéphalisation de l'embryon, ce qui lui a valu son nom, terme de l'argot anglais qui signifie « tête ».

f) Voies d'induction intercellulaire par contact

- **Système Delta-Notch** : lors du contact entre deux cellules, des récepteurs protéiques transmembranaires Notch, présents à la surface de l'une d'entre elles, peuvent se lier avec des protéines membranaires portées par la cellule adjacente (protéines Delta, Serrate ou Jagged). A la suite de cette liaison, Notch subit une transformation dans sa conformation qui permet le clivage de son domaine cytoplasmique par une protéase. Le fragment protéique ainsi isolé migre dans le noyau et active un facteur de transcription de la famille CSL en s'y associant (fig 11.2).

Des récepteurs Notch se trouvent à la surface de presque tous les types de cellules. Ce mode de transmission des signaux entre cellules en contact est très répandu dans de nombreux types de développement chez les Métazoaires. Nous verrons un exemple de son fonctionnement dans l'étude de la somitogenèse (voir § 15.6).

- **Les éphrines et leurs récepteurs Eph** forment également des voies de transmission des signaux. Les éphrines sont des protéines transmembranaires (groupe B) ou des protéines attachées à la surface des cellules sécrétrices par une liaison GPI (groupe A). Leurs récepteurs sont des récepteurs à activité tyrosine-kinase (Eph A et Eph B) et la transmission d'information ne s'effectuera qu'entre cellules contiguës.

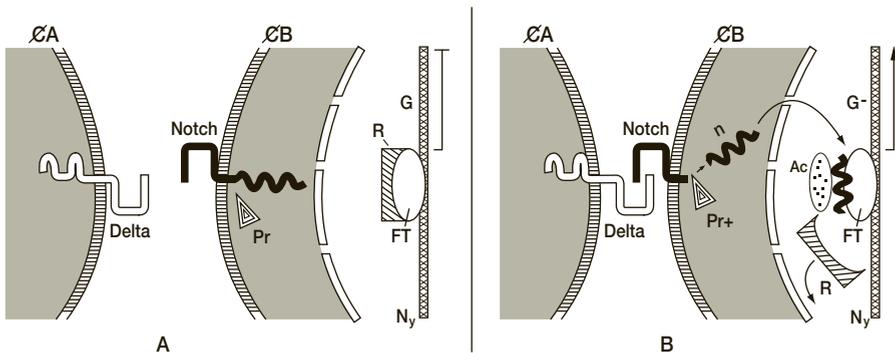


Figure 11.2 - Régulation de la transcription d'un gène déclenchée par l'activation d'un récepteur membranaire Notch.

A : La cellule (B) possède des récepteurs Notch, mais n'est pas en contact avec d'autres cellules (A) équipées de Delta. Le récepteur possède un domaine extracellulaire qui peut se lier avec Delta ou Serrate, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui peut être clivé par l'action d'une protéase spécifique (Pr). Un gène (G) inactivé dans le noyau (Ny) est représenté avec un facteur de transcription (FT) et son répresseur (R).

B : Une cellule (A) entre au contact de la cellule B. La liaison Delta-Notch active la protéase (Pr+) qui isole le domaine cytoplasmique de Notch (n). Celui-ci migre dans le noyau (Ny) déplace le répresseur et se lie au facteur de transcription et à des activateurs (Ac); la transcription du gène est alors possible.

Le système Eph/éphrines constitue un régulateur clé dans les processus d'attraction/répulsion, d'adhérence et de migration cellulaires. Il intervient notamment dans la neurogenèse (guidage axonal) et dans la somitogenèse (voir § 15.6.2).

11.2 SUPPORT GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DE L'EMBRYON DE DROSOPHILE

Trois catégories de gènes concourent successivement à l'organisation de l'embryon durant les phases précoces de son développement : les gènes de polarité, les gènes de segmentation et les gènes homéotiques.

11.2.1 Les gènes de polarité

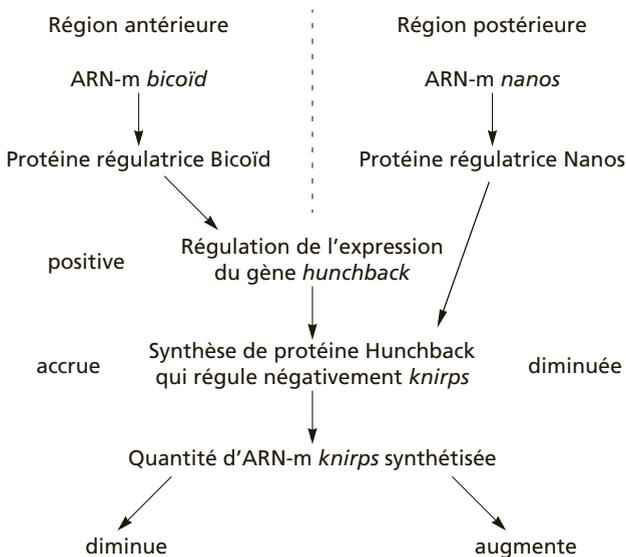
Leur expression conditionne la spécification des polarités de l'organisme, c'est-à-dire la mise en place des axes antéro-postérieur (céphalo-caudal) et dorso-ventral.

Elle résulte de la traduction d'ARN-m transcrits pendant l'ovogenèse (tableau 11.1 et fig. 11.3).

Nous avons vu que l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'ovocyte est contrôlé par des gènes de polarité (§ 3.5.4). La traduction des ARN-m qui expriment ces gènes contrôle la polarité de l'embryon.

Dans l'œuf fécondé, les ARN-m de *bicoid* sont traduits en une protéine qui est distribuée suivant un gradient de concentration décroissant d'avant vers l'arrière dans le cytoplasme de l'embryon.

Tableau 11.1 - Régulation de l'expression d'un gène de segmentation (*knirps*) sous l'action combinée des gènes maternels de polarité, *nanos* et *bicoid*.



Pénétrant dans les noyaux en division, la protéine Bicoïd stimule la transcription du gène zygotique *hunchback*, augmentant ainsi la concentration du produit correspondant dans la région antérieure de l'embryon. Elle inhibe d'autre part la traduction des ARN-m *caudal* ; la protéine Caudal sera donc plus abondante dans la partie caudale de l'embryon où la protéine Bicoïd est absente.

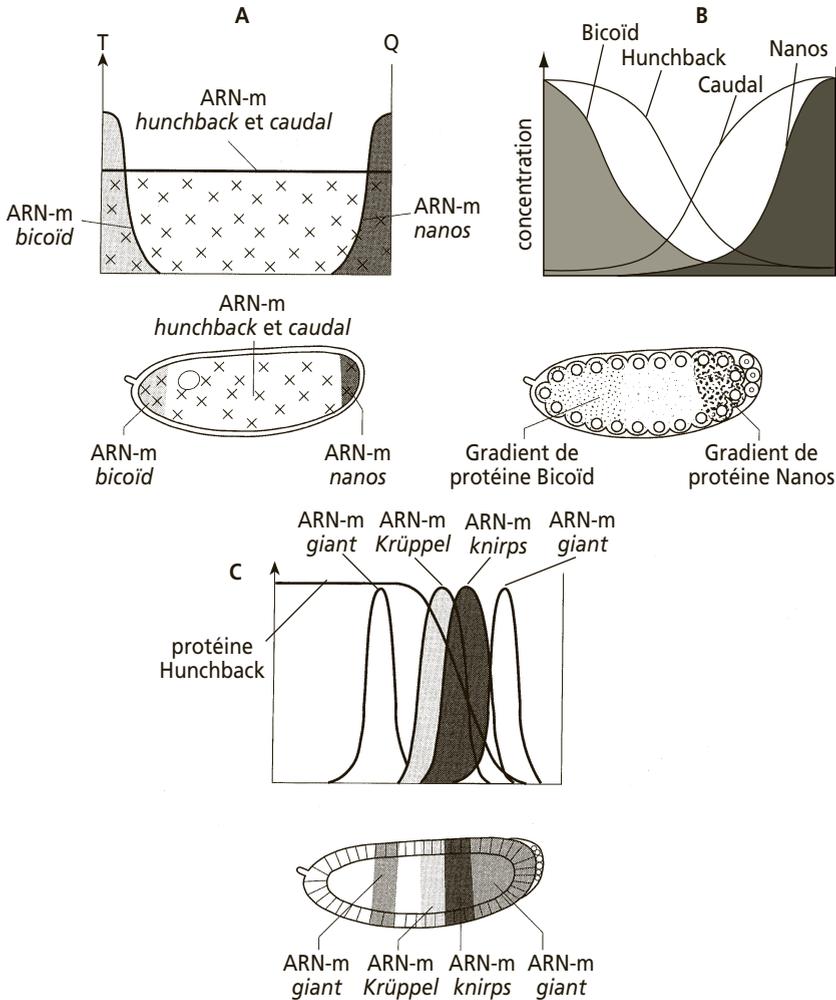


Fig. 11.3 – Régulation de l'expression des premiers gènes de segmentation chez l'embryon de drosophile.

A : Répartition dans l'œuf des ARN-m *bicoïd*, *nanos*, *hunchback* et *caudal*.

B : Au début du développement, gradient de répartition des protéines qui sont la traduction de ces ARN-m. La protéine Bicoïd stimule la transcription du gène zygotique *hunchback* et inhibe la traduction des ARN-m *caudal*; la protéine Nanos inhibe la traduction des ARN-m *hunchback*.

C : Le taux de concentration de la protéine Hunchback, décroissant d'avant vers l'arrière, régule différemment l'expression des gènes « gap » *giant*, *Krüppel* et *knirps*.

Dans la région caudale de l'embryon, l'ARN-m *nanos* est traduit en une protéine qui se distribue suivant un gradient inverse du précédent. La protéine Nanos inhibe la traduction des ARN-m *hunchback*, en liaison avec une autre protéine régulatrice. Très rapidement, deux nouveaux gradients des protéines régulatrices Caudal et Hunchback, orientés en sens opposé, se mettent ainsi en place (fig. 11.3 A-B).

Les protéines Bicoïd et Nanos en agissant sur l'expression des gènes *hunchback* et *caudal*, entraînent une suite de régulations. Dans la région antérieure, les protéines Bicoïd et Hunchback agissent en synergie pour activer l'expression de certains gènes de la tête. Par ailleurs, la protéine Hunchback inhibe, dans les territoires où elle est présente, le gène *knirps* qui gouverne la formation de structures abdominales. La synthèse des ARN-m de *knirps* sera donc réprimée dans la région antérieure et sera normale dans la région postérieure où les protéines Knirps activeront la chaîne des synthèses nécessaires à la différenciation de l'abdomen. D'autres gènes interviendront dans le transport, l'établissement et le maintien du gradient.

11.2.2 Organisation dorso-ventrale de l'embryon

Elle résulte de la translocation sélective d'un facteur de transcription dans les noyaux du blastoderme ventral.

Un développement harmonieux de l'embryon est le résultat de l'équilibre entre l'expression des gènes du groupe *dorsal* (pour lesquels on connaît onze mutations qui perturbent la dorsalisation) et du gène qui contrôle la ventralisation, le gène *cactus*. La différence entre l'aire du blastoderme ventral et l'aire dorsale résulte de l'exécution d'un programme établi pendant l'ovogenèse et que nous avons rapidement décrit (voir § 3.5.4e) : c'est dans la région ventrale que les récepteurs Toll de la membrane ovocytaire sont activés, déclenchent des réactions qui dégradent la protéine Cactus, la détachent de la protéine Dorsal, ce qui permet à celle-ci de pénétrer dans les noyaux et d'exercer ses fonctions régulatrices. Les ARN-m *dorsal* sont transcrits dans les cellules nourricières et transportés dans l'ovocyte où ils ne sont traduits en protéines que tardivement, une heure et demie environ après la fécondation, le blastoderme étant en cours de formation. La quantité par énergide (ou plus tard, par cellule) de la protéine Dorsal est à peu près constante dans tout le blastoderme mais sa localisation, dans le noyau ou dans le cytoplasme, varie suivant qu'on se trouve dans le blastoderme dorsal ou ventral. Dans le noyau, ce facteur de transcription détermine la ventralisation des cellules du blastoderme en activant des gènes de ventralisation (*snail* et *twist*) et en réprimant des gènes de dorsalisation (*decapentaplegic*, *zerknüllt* et *tolloid*). Dès la formation du blastoderme syncytial, la protéine régulatrice Dorsal est dans les noyaux de la face ventrale où sa concentration est maximale, puis elle décroît dans les noyaux latéraux du blastoderme et devient nulle dans ceux de la région dorsale. À l'inverse, sa concentration dans le cytoplasme augmente suivant le même gradient ventro-dorsal. Après le quatorzième cycle de division des noyaux, les territoires embryonnaires sont déterminés en fonction de la concentration nucléaire en protéine Dorsal. Dans la bande cellulaire axiale ventrale, où elle est la plus forte, se différenciera le mésoderme. Les territoires situés

de part et d'autre de cette zone deviendront en allant vers la région dorsale où les concentrations deviennent de plus en plus faibles, du neurectoderme, de l'épiderme ventral puis de l'épiderme dorsal et enfin de la séreuse amniotique (voir fig. 7.2).

Chez les mutants où les formations dorsales sont prédominantes, la protéine est présente exclusivement dans le cytoplasme des cellules du blastoderme. Chez les mutants *cactus* où les caractères sont exclusivement ventraux, la protéine régulatrice Dorsal ne se trouve que dans les noyaux.

11.2.3 Les gènes de segmentation

Des expressions successives de ce type de gènes régulateurs seront à l'origine de la mise en place d'une organisation métamérisée de l'embryon qui s'exprimera par l'apparition d'une segmentation corporelle.

La répartition en gradients des protéines codées par les gènes régulateurs des polarités antéro-postérieure et dorso-ventrale crée un environnement particulier pour chaque noyau de segmentation suivant la région du blastoderme où il aura migré. Dans les noyaux du blastoderme, ces protéines vont réguler l'expression de plusieurs populations de gènes régulateurs : les **gènes de segmentation**. Ils sont au nombre d'une vingtaine (tableau 11.2) et seront activés différenciellement dans des régions séparées progressivement par des sillons ectodermiques qui découpent superficiellement le blastoderme de façon transversale, (fig. 11.4). Au cours de ce processus, des aires ne correspondant pas exactement aux métamères de la larve et de l'adulte se mettent en place de façon transitoire : ce sont, au nombre de 14, les **parasegments** à cheval sur 2 métamères successifs. Les véritables segments correspondant aux métamères n'apparaissent qu'ultérieurement.

L'activation des gènes de segmentation comporte 3 étapes et concerne successivement les **gènes « gap »**, les **gènes « pair-rule »**, et les **gènes de polarité segmentaire**. On peut considérer, en simplifiant, que chaque génération de gène code pour des protéines régulatrices qui agissent sur l'expression des gènes de la génération suivante.

Tableau 11.2 - Liste des gènes de segmentation de la drosophile.

Gènes gap	<i>Krüppel</i> <i>knirps</i> <i>hunchback</i> <i>giant</i> <i>orthodenticle</i>	(<i>Kr</i>) (<i>kni</i>) (<i>hb</i>) (<i>gt</i>) (<i>otd</i>)	<i>tailless</i> <i>huckebein</i> <i>buttonhead</i> <i>empty spiracles</i>	(<i>tll</i>) (<i>hkb</i>) (<i>btd</i>) (<i>ems</i>)
Gènes pair-rule primaires	<i>hairy</i> <i>even-skipped</i>	(<i>h</i>) (<i>eve</i>)	<i>runt</i>	(<i>run</i>)
Gènes pair-rule secondaires	<i>fushi tarazu</i> <i>odd-paired</i> <i>odd-skipped</i>	(<i>ftz</i>) (<i>opa</i>) ₁ (<i>odd</i>) ₂	<i>sloppy-paired</i> <i>paired</i>	(<i>slp</i>) (<i>prd</i>)
Gènes de polarité segmentaire	<i>engrailed</i> <i>wingless</i> <i>cubitus interruptus</i> <i>hedgehog</i> <i>fused</i>	(<i>en</i>) (<i>wg</i>) (<i>cb</i>) (<i>hh</i>) (<i>fu</i>)	<i>armadillo</i> <i>patched</i> <i>gooseberry</i> <i>pangolin</i>	(<i>arm</i>) (<i>ptc</i>) (<i>gsb</i>) (<i>pan</i>)



Il convient de signaler l'ambiguïté terminologique liée à l'emploi du mot **segment**. Ce terme correspond ici à celui de métamère et la segmentation désigne alors la mise en place de la métamérisation.

Cependant, une acception plus large du terme est couramment utilisée pour désigner le fait qu'un animal présente une organisation répétitive visible extérieurement, même si les segments ne sont pas l'expression de la métamérisation (exemple du Ténia, ver segmenté, chez lequel les unités corporelles observées, les proglottis, n'ont pas valeur de métamères).

a) Les gènes « gap »

Au nombre de 9 actuellement connus (tableau 11.2), ce sont des gènes dont une mutation détermine un vide (ou « gap ») dans l'organisation de la larve. Ce sont ces anomalies qui ont permis de les définir. Chaque gène s'exprime dans un ensemble de parasegments qui lui est propre. Dans la mutation *Krüppel*, par exemple, il manque des régions correspondant aux parasegments 4 à 6, c'est-à-dire ceux à partir desquels s'élaborent les trois segments thoraciques et le premier abdominal. Ce gène exerce normalement, dans le territoire où il s'exprime, une inhibition des gènes « gap » actifs dans les territoires voisins. Chez les animaux normaux, les gènes « gap » s'expriment sous l'effet régulateur des produits des gènes de polarité (voir § 3.5.4).

Le gène *hunchback* est, par exemple, régulé positivement par la protéine Bicoïd et les transcrits correspondants (fig. 11.3) seront normalement traduits en protéine régulatrice Hunchback dans les parasegments antérieurs du corps. En s'approchant de la partie postérieure du corps, la traduction de ces ARN-m en protéines sera progressivement inhibée par une quantité croissante de la protéine de polarité Nanos qui inhibe la traduction de Hunchback ; la protéine sera par conséquent présente suivant un gradient décroissant vers l'arrière (fig. 11.3).

Les gènes « gap » influencent leur expression mutuelle par le jeu de leurs protéines et délimitent ainsi des frontières entre leurs domaines respectifs d'expression. La protéine Hunchback, par exemple, contrôle les territoires où sont transcrits en ARN-m trois autres gènes « gap » (*giant*, *Krüppel* et *knirps*), chacun d'eux étant activé par une (ou des) concentration(s) différente(s) de cette protéine.

Dans la partie postérieure de l'embryon, c'est la protéine Caudal, distribuée suivant un gradient inverse de la protéine Hunchback qui régule l'expression de *knirps* et du second site de *giant*.

Les aires de répartition de ces protéines régulatrices sont plus larges que celles des ARN-m correspondants car elles diffusent après leur sécrétion. Plusieurs protéines régulatrices peuvent ainsi être présentes dans un même territoire, combinant leurs actions, ce qui, au fur et à mesure que le développement progresse, crée pour les cellules de l'embryon un équipement régulateur de plus en plus diversifié.

b) Les gènes « pair-rule »

Ces gènes, au nombre de 8 (tableau 11.2), sont activés en deux étapes, dès le 13^e cycle mitotique, dans l'embryon déjà compartimenté en territoires par les gènes « gap ».

Trois gènes « pair-rule » dits primaires (ou précoces) sont sous le contrôle de protéines régulatrices codées par les gènes « gap » ; les 5 autres gènes, « pair-rule »

dits tardifs (ou secondaires), sont sous le contrôle des protéines régulatrices codées par les 3 premiers gènes « pair-rule ». L'expression de ces différents gènes se manifeste quand le blastoderme est encore syncytial. Chaque gène s'exprime au niveau de rangées de noyaux organisées le long de l'axe céphalo-caudal, et qui alternent avec des rangées où il ne s'exprime pas. Étant donné que pour chacun de ces gènes, la succession des rangées de noyaux où il s'exprime ou non est différente, il en résulte que chaque rang de noyaux possède probablement son assortiment propre de 35 protéines régulatrices. Cette organisation qui définira les parasegments est donc le résultat d'une série de régulations géniques exercées par les protéines issues de l'expression antérieure de gènes « gap ».

L'expression de ces gènes « pair-rule » est aussi stabilisée ou régulée par des interactions. Par exemple, l'activité du gène *fushi tarazu* (en japonais : trop peu de segments) produit des protéines, dans tous les parasegments, au début du 14^e cycle mitotique. C'est un gène « pair-rule » tardif. Sa transcription est rapidement réprimée dans certaines rangées de noyaux où des gènes « pair-rule » précoces exercent une régulation négative ; ces rangs alternent avec d'autres où, en l'absence des inhibiteurs, les protéines Fushi tarazu stimulent leur propre synthèse (fig. 11.4).

c) Les gènes de polarité segmentaire

Ils s'expriment lorsque le syncytium se compartimente. Les cellules du blastoderme vont interagir par le jeu des gènes de polarité segmentaire. Leur action va aboutir à diviser les domaines des gènes « pair-rule » en 14 bandes de transcription, chacune étant large de 1 à 2 rangs de cellules (fig. 11.4 A).

Il y a 9 gènes (tableau 11.2) transcrits chacun à partir d'une bande de noyaux dans chaque parasegment. Ce sont les produits des gènes « pair-rule » qui définissent quels noyaux peuvent exprimer un gène de polarité segmentaire particulier. Par exemple, (fig. 11.4 B) dans les cellules d'un parasegment, le gène *engrailed* est exprimé si l'une ou l'autre des protéines « pair-rule » Even-skipped ou Fushi tarazu est présente ; le gène *wingless*, au contraire, ne s'exprime que si l'une et l'autre sont absentes, mais *odd paired* doit être exprimé. Une mutation d'un gène « pair-rule », comme *fushi tarazu* altère l'ordre des cellules où les conditions d'expression de *wingless* sont favorables, et il peut alors se trouver exprimé dans deux rangées de cellules adjacentes. L'expression des gènes *wingless* et *engrailed* se maintient grâce à des interactions entre les cellules exprimant l'un ou l'autre de ces deux gènes. Chaque type de cellule stimule par ses sécrétions l'expression des gènes spécifiques de l'autre, maintenant ainsi la stabilité du plan établi par le produit des gènes de polarité.

Au début de la gastrulation, le blastoderme, à l'exclusion de l'endoderme présomptif, est donc constitué de rangées de cellules organisées en parasegments polarisés, se succédant suivant l'axe céphalo-caudal, chaque parasegment étant aussi polarisé dorso-ventralement. Outre les gènes de polarité, 26 gènes de segmentation sont intervenus pour établir cet ordre. C'est dans cet embryon que les structures propres à chaque segment seront définies par l'expression des gènes sélecteurs homéotiques.

11.2.4 Les gènes sélecteurs homéotiques¹

Cette troisième série de gènes intervient pour spécifier phénotypiquement les structures caractéristiques de chaque segment.

Ils sont connus grâce à des mutations qui provoquent la transformation d'une partie du corps en une autre, phénomène qui fut observé et décrit par Bateson (1894) et désigné par celui-ci, d'après un terme grec, sous le nom d'« **homéosis** » (voir encart 11.2). Ces mutations ont été appelées **homéotiques** et les gènes correspondants, **gènes sélecteurs homéotiques**, car ils sélectionnent les gènes activés dans chaque segment.



ENCART 11.2 Historique de la mise en évidence des gènes homéotiques

Les généticiens de la drosophile se sont attachés depuis près de 50 ans à identifier les gènes responsables des mutations homéotiques connues.

Lewis (1950) a montré que la mutation *Bithorax* (formation d'une seconde paire d'ailes sur le troisième segment thoracique, à la place de balanciers), résulte de la mutation d'un seul gène ; il en est de même pour la mutation *Antennapedia*, où les antennes de la mouche mutante sont remplacées par des pattes. Étant donné que la différenciation de ces organes nécessite en réalité l'expression d'une cascade de gènes, les chercheurs ont pensé que tout gène qui, à lui seul pouvait modifier à ce point une organogenèse, était un gène directeur de celle-ci. Une recherche systématique pour identifier de tels gènes a été entreprise dès que les progrès du génie génétique l'ont permis et différents groupes de chercheurs, notamment aux États-Unis et en Suisse, découvrirent successivement, dès 1980, la série des **gènes homéotiques** (voir §11.1.1a).

En 1983, Gehring et McGinnis, à Bâle, ont montré qu'une séquence de bases quasi identique se trouvait dans l'ADN de ces différents gènes et la séquence fut établie par Scott. On en conclut rapidement qu'ils résultaient de l'amplification d'un gène ancestral unique. L'intérêt devint général chez les embryologistes lorsqu'il fut montré que de nombreux embranchements d'invertébrés et les différentes classes de Vertébrés possédaient aussi des gènes codant pour des protéines régulatrices, actifs au cours du développement et contenant cette séquence conservée avec un degré d'homologie étonnant. On fit l'hypothèse que ces gènes pouvaient avoir des fonctions comparables dans tous les groupes et que saisir leur rôle pouvait permettre de comprendre un mécanisme général à tous les développements embryonnaires.

Chez la drosophile, ces gènes s'expriment dès la gastrulation, c'est-à-dire dans les cellules d'un blastoderme qui ont reçu toutes les informations décrites dans le paragraphe précédent et qui ont connaissance de leur position le long de l'axe antéro-postérieur. Les gènes homéotiques s'expriment à leur tour avant toute différenciation et des protéines régulatrices sont mises en évidence dans des territoires correspondant à des parasegments ou à des fractions de métamères. Ils continueront à s'exprimer après le début de la morphogenèse.

1. Ou gènes homéotiques.

a) Cartographie des gènes sélecteurs homéotiques (fig. 11.5) ; Règle de colinéarité

Chez la drosophile, on a localisé ces gènes sur le chromosome 3 où, regroupés pour la plupart en 2 régions, ils forment 2 complexes de gènes :

- Le complexe « **Antennapedia** » avec 5 gènes qui déterminent des structures de la tête et du thorax.
- Le complexe « **Bithorax** » qui détermine des structures du 3^e segment thoracique et de l'abdomen.

L'ensemble de ces deux complexes de gènes a été appelé initialement **complexe HOM** ou **HOM-C** (E. Lewis). Actuellement cette terminologie est progressivement remplacée par la dénomination générale **Hox** désignant l'ensemble des gènes homéotiques. Ses gènes ont été clonés et des sondes d'ADNc permettent, par hybridation *in situ*, de localiser les ARN-m qu'ils transcrivent dans des régions spécifiques de l'embryon. L'aire d'expression de chacun de ces gènes a une répartition

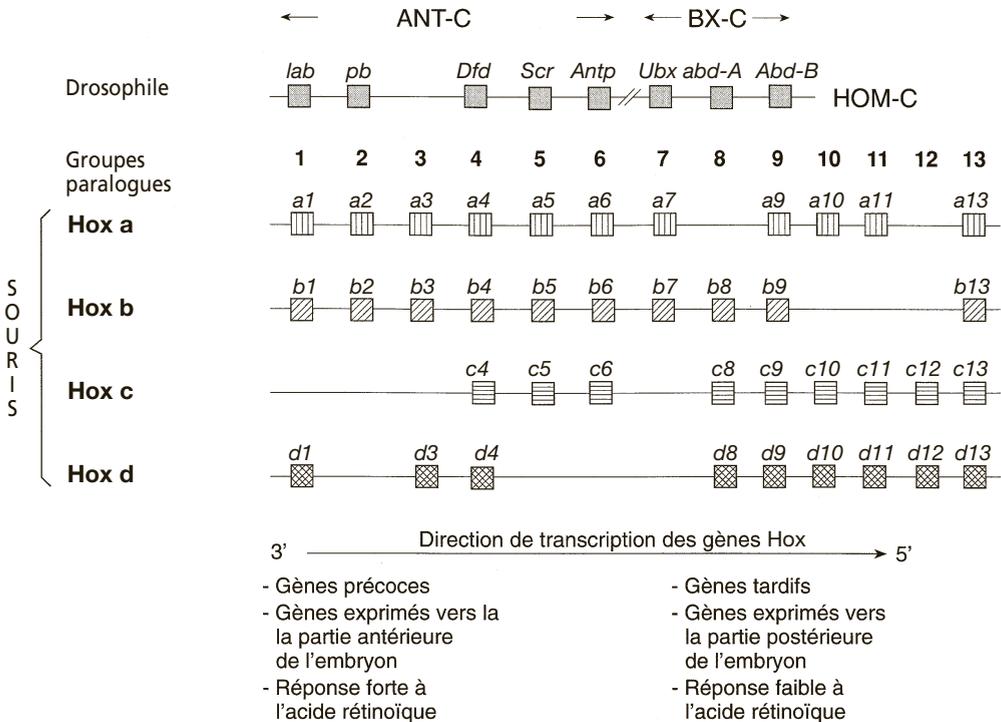


Figure 11.5 - Cartes de répartition des gènes régulateurs homéotiques de la drosophile et d'un Mammifère.

En haut : Complexe HOM-C, sur le chromosome 3 de la drosophile regroupant les complexes de gènes Antennapedia (ANT-C) et Bithorax (BX-C). En bas : Représentation cartographique des 4 complexes Hox : a, b, c, d portés par 4 chromosomes différents. On distingue 13 groupes paralogues ; les gènes HOM et Hox appartenant à un même groupe paralogue présentent de fortes homologies. Les blancs existant sur cette carte correspondent peut-être à des gènes restant à découvrir.

caractéristique le long de l'axe antéro-postérieur de l'animal qui respecte la règle de colinéarité, avec une limite d'expression antérieure très nette et un taux d'expression décroissant d'avant en arrière.

On appelle **règle de colinéarité** la constatation suivante : l'ordre dans lequel les gènes homéotiques sont localisés sur le chromosome 3 de la drosophile, établi en suivant le sens de leur transcription (de 3' en 5'), est identique à l'ordre dans lequel se succèdent les aires anatomiques où ces gènes s'expriment dans le sens céphalo-caudal (fig. 11.6).

Cette règle se vérifie chez tous les animaux possédant des gènes homéotiques, notamment chez les Vertébrés (voir § 11.3).

Lorsqu'un gène régulateur ne s'exprime plus dans son territoire normal d'expression à la suite d'une mutation, un autre gène impose son information de position : si, par exemple, *Ultrabithorax* (*Ubx*) ne s'exprime plus dans la partie antérieure de l'abdomen, où il permet la différenciation des premiers segments abdominaux, *Antennapedia* (*Antp*) qui régule les différenciations thoraciques s'exprime alors dans ces segments où il est normalement réprimé et commande le développement de structures thoraciques supplémentaires dans l'abdomen.

b) Structure d'un gène homéotique

Tous les gènes homéotiques sont des homéogènes (voir §11.1.1a). Ils contiennent donc (ainsi que quelques autres gènes de développement, comme *bicoid*) une séquence de 180 paires de base, l'« **homéobox** » ou **homéoboîte** codant pour une séquence de 60 acides aminés qui constitue le domaine de liaison à l'ADN de la protéine régulatrice. C'est l'**homéodomaine**.

Ces homéodomains sont importants car ils déterminent les sites de liaison des protéines régulatrices sur l'ADN, et donc le gène, ou les gènes, qui seront régulés, par activation ou inhibition de la transcription, dans les cellules où ces protéines sont présentes. Ce sont donc ces homéodomains qui déterminent le (ou les) gène(s) que régulera chaque protéine régulatrice.

Les homéodomains de toutes ces protéines régulatrices sont extrêmement proches par leur structure et ne diffèrent entre eux que par quelques acides aminés. Ce degré d'homologie élevé entre les gènes homéotiques résulterait de leur origine commune. Ils seraient le produit d'une amplification d'une séquence hypothétique, la **séquence consensus**, reconstituée par comparaison entre elles des séquences actuelles. Survenue probablement chez l'ancêtre des Arthropodes, au Précambrien, cette amplification a donné lieu à une série de gènes qui auraient ensuite évolué indépendamment, leur taux d'homologie restant obligatoirement très élevé au niveau de l'homéodomaine.

Par exemple, la protéine codée par le gène *labial* (*lab*) ne diffère de la séquence consensus que par 19 acides aminés sur 60, celle du gène *Deformed* (*Dfd*) par 10 acides aminés, et celle du gène *Antennapedia* par 1 seul. Ces faibles différences

dans la structure de leur homéodomaine permettent cependant à chacune d'elles de se lier préférentiellement aux séquences régulatrices d'un gène déterminé. La nature de la régulation, activation ou inhibition, dépendra aussi d'autres domaines de la protéine régulatrice.

c) Mise en évidence du rôle de l'homéodomaine dans la spécificité d'une protéine régulatrice Hox

Les techniques de génie génétique ont permis de construire des gènes chimères qui sont introduits ensuite dans l'œuf de drosophile et s'incorporent au génome.

Dans les expériences qui montrent le rôle spécifique de l'homéodomaine, on construit la chimère en remplaçant une homéoboîte par une autre dans un gène homéotique et on montre que le gène chimère fabriqué a les spécificités de liaison correspondant à sa nouvelle homéoboîte.

Ainsi l'homéoboîte de *Ultrabithorax* peut être insérée dans le gène *Deformed* et, dans une autre expérience, l'homéoboîte de *Abdominal B* (*Abd-B*) est insérée dans *Deformed*. On fabrique ainsi deux chimères ayant en commun le gène *Deformed* mais des homéoboîtes différentes.



Pour être certain que le gène chimère sera transcrit dans l'œuf, et donc sera fonctionnel, on le lie expérimentalement à des séquences d'ADN qui commandent l'expression d'un autre gène adjacent en fonction d'une certaine température. Le complexe génique ainsi construit est thermoactivable. Les drosophiles peuvent supporter, pendant un temps court, un élevage à 37 °C. Leur brève survie suffit pour étudier comment les protéines produites par traduction des gènes thermoactivés agissent sur le génome des cellules cibles.

Dans l'exemple choisi, la chimère *Deformed-Ultrabithorax* aura la même cible que la protéine codée par le gène *Ultrabithorax* normal, c'est-à-dire qu'elle agira sur l'expression de l'homéogène qui le précède, *Antennapedia*. La chimère *Deformed-Abdominal B* aura pour cible les gènes que régule normalement *Abdominal B*.

Toutefois, si la cible est bien déterminée par l'homéodomaine, le type de régulation semble dépendre d'autres régions de la protéine régulatrice. En effet, les protéines qui sont la traduction de *Ultrabithorax* et de *Abdominal B* normaux inhibent l'expression des gènes qui sont leur cible. *Deformed* code pour une protéine régulatrice qui active sa cible (qui est son propre gène en l'occurrence). En revanche, les deux protéines chimères expérimentales qui, hors des homéodomains comprennent les séquences de *Deformed*, sont toutes deux activatrices.

d) Expression des gènes homéotiques (fig. 11.6)

- *L'expression des gènes homéotiques est régulée par des protéines codées antérieurement par des gènes « gap » ou « pair-rule ».*

Il a été montré, par exemple, que les trois gènes homéotiques, *sex combs reduced* (*scr*), *Antennapedia* et *Ultrabithorax*, qui s'expriment dans trois segments, sont activés par la protéine Fushi tarazu, codée par un gène « pair-rule ». Le gène *Deformed*, dont le domaine d'expression est plus antérieur est, lui, inhibé par la protéine

Fushi tarazu. Le domaine d'expression de *fushi tarazu* recouvre celui de ces quatre gènes. Chez les embryons ayant subi la mutation *fushi tarazu*, il n'y a ni activation des trois premiers gènes homéotiques, ni inhibition du dernier.

- Les gènes homéotiques exercent entre eux un contrôle de leur domaine d'activité respectif.

Chaque gène est inhibé en direction postérieure par la protéine régulatrice codée par celui qui le suit. C'est ainsi que le gène *Ultrabithorax* réprime *Antennapedia*. Une délétion de *Ultrabithorax* permet à *Antennapedia* de s'exprimer dans le domaine où il est déficient; il en résulte la formation d'ailes dans le troisième segment thoracique.

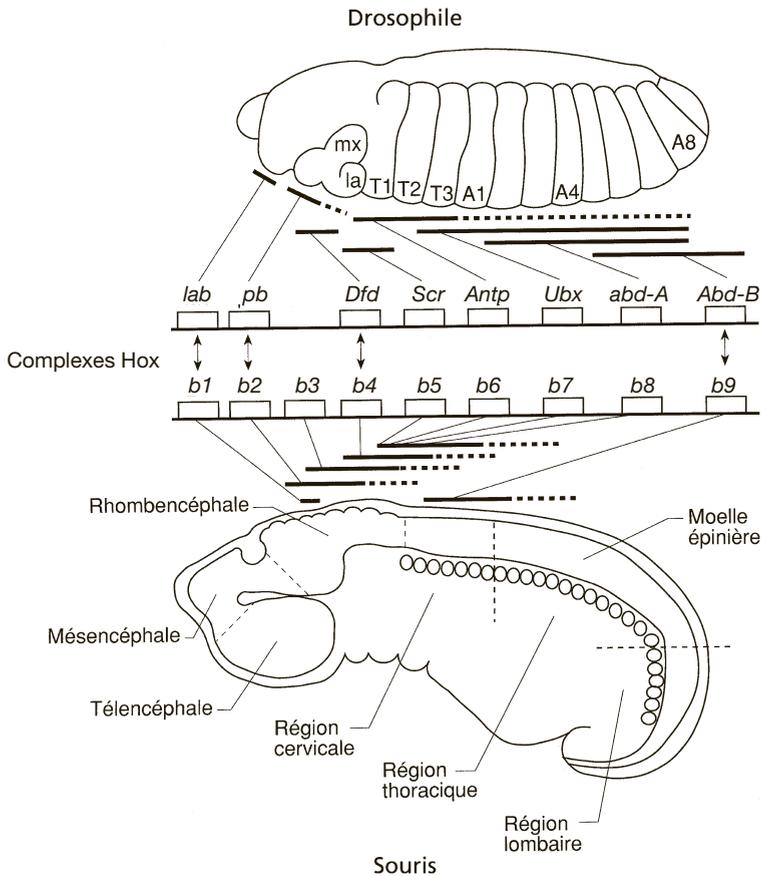


Figure 11.6 - Représentation des domaines d'expression des homéogènes du complexe Hox de la drosophile, et de Hoxb de la souris.

Les gènes paralogues sont exactement superposés sur les deux cartes. On constate que, pour chaque gène, la limite d'expression antérieure est bien tranchée et que leur expression va en diminuant vers la région caudale. Pour une région donnée du corps, plusieurs gènes homéotiques peuvent s'exprimer, avec parfois des degrés d'intensité différente.

- *Un même gène homéotique peut exercer des contrôles différents.*

Certains gènes homéotiques ont plusieurs promoteurs et des sites d'initiation de la transcription qui sont activés par des protéines régulatrices qui diffèrent suivant les régions de l'embryon.



Le gène *Antennapedia* a deux produits de transcription :

- L'un dont la transcription est activée, à partir du 1^{er} promoteur, par la protéine régulatrice codée par *Krüppel*. Cette transcription est supprimée par la protéine régulatrice codée par *Ultrabithorax*.
- L'autre dont la transcription est activée par deux protéines régulatrices codées par les gènes *hunchback* et *fushi tarazu* ; elle est inhibée par la protéine codée par *oskar*.
- Finalement, la protéine *Antennapedia* produite dans les deux voies est la même mais ses effets seront différents, car les gènes régulateurs ci-dessus ne s'expriment pas dans les mêmes ébauches embryonnaires : dans le premier cas, la protéine *Antennapedia* intervient dans le développement du thorax dorsal et, dans le second cas dans le développement du thorax ventral, la différenciation des pattes, et la viabilité de l'embryon.

- *Certains gènes homéotiques peuvent produire plusieurs protéines régulatrices par le jeu de l'épissage alternatif*

Ultrabithorax produit ainsi deux protéines différentes, mais dont les spécificités se superposent partiellement. Au stade de passage entre la 2^e et la 3^e mue, elles transforment toutes deux une antenne en patte. Par contre, à un stade plus jeune, une seule de ces protéines est importante dans la détermination de l'identité des parasegments.

11.2.5 Différenciation d'un tissu ou d'une ébauche génétiquement programmée

Lorsque l'ensemble des gènes de polarité, de segmentation et des gènes homéotiques s'est exprimé, des gènes codant pour des protéines spécifiques d'organes ou de tissus sont activés par des protéines régulatrices homéotiques et un organe ou un tissu se différencie. Ces activations spécifiques sont actuellement étudiées.

On a par exemple précisé les relations entre la protéine *Antennapedia* et la différenciation d'une antenne ou d'une patte, à l'aide d'une méthode permettant de repérer les gènes activés par *Antennapedia*. Un gène *salm* est exprimé dans les disques imaginaux¹ des antennes, mais ne l'est pas dans les disques des pattes, car ce gène y est réprimé par *Antennapedia* dont le domaine d'expression ne commence qu'au niveau du thorax (voir fig. 11.6). Dans la mutation *Antennapedia*, qui provoque l'expression du gène homéotique au niveau de la tête, le gène *salm* est réprimé également dans les disques imaginaux d'antennes, qui se différencient alors en pattes. La mise en évidence d'un tel gène qui semble être indispensable pour la différenciation d'un appendice en patte, constitue une avancée vers l'identification de gènes spécifiques d'organes ou de tissus.

1. Invaginations ectodermiques formées de cellules indifférenciées mais déterminées, présentes chez les larves d'insectes à métamorphose complète et qui sont à l'origine d'organes ectodermiques chez l'adulte (ailes, antennes, pattes, etc.).

11.3 LES GÈNES RÉGULATEURS DANS LE DÉVELOPPEMENT DES VERTÉBRÉS

Le nombre des gènes régulateurs identifiés qui contrôlent les premières étapes du développement chez les Vertébrés, ne cesse de croître, et cet ouvrage ne peut qu'en donner un aperçu restreint.

Ils contrôlent l'établissement des axes antéro-postérieur, dorso-ventral, ainsi que l'organisation de la dissymétrie droite-gauche. Certains d'entre eux entrent en jeu à la fin de la segmentation ou au moment de la gastrulation et leur étude est reportée au chapitre 14 qui traite de l'ensemble des phénomènes d'induction.

La définition des organes qui se différencient le long de l'axe antéro-postérieur, est plus tardive. Ils sont sous le contrôle de plusieurs familles de gènes qui déterminent le patron de l'organogenèse. Ils présentent de grandes similitudes avec ceux de la drosophile, c'est la raison pour laquelle il nous a paru préférable de les présenter immédiatement pour mieux les comparer, avant toute étude de la morphogenèse. Nous examinerons l'expression et les effets des **gènes sélecteurs homéotiques** dans la régionalisation antéro-postérieure du corps et la différenciation polarisée des membres et évoquerons des gènes de la famille de *bicoid* plus récemment découverts, ainsi que les gènes *Pax*.

11.3.1 Les gènes sélecteurs homéotiques dans la différenciation antéro-postérieure du corps

a) À la suite de duplications, il existe chez les Vertébrés, quatre complexes de gènes homologues à ceux des gènes Hox de la drosophile (fig. 11.5 et 11.6)

En 1983, de Robertis eut l'idée, considérée alors comme irréaliste, de rechercher des homéogènes dans l'ADN de xénope à l'aide d'une sonde d'ADNc établie à partir de la drosophile. Le succès qui s'en suivit avec l'isolement et le séquençage d'un gène contenant une homéoboîte, déclencha une série de recherches aboutissant à reconnaître chez tous les Vertébrés (la souris en 1984, l'homme en 1986) des gènes homéotiques possédant de fortes homologues avec ceux de la drosophile. Entre le produit d'un gène de drosophile, *Antennapedia* par exemple, et celui du gène *Hoxb-6* qui lui correspond chez la souris, la différence n'est que de 4 acides aminés.

La règle de colinéarité (voir définition § 11.2.4a) fut retrouvée chez la souris d'abord, puis chez les autres Vertébrés. On a montré ensuite que les Vertébrés possèdent non pas 1 mais 4 complexes de gènes à homéoboîte dans lesquels le même ordre existe. Ce sont

- chez la souris les complexes *Hox a* à *d* portés par les chromosomes 6, 11, 15 et 2.
- chez l'humain les complexes *HOXA* à *D* portés par les chromosomes 7, 17, 12 et 2.

Chez les Mammifères, 39 gènes sont actuellement connus. Ils sont alignés dans le même ordre que les régions du corps dont ils commandent le développement embryonnaire et leurs homéoboîtes ont de fortes similitudes avec celles des gènes

des complexes Antennapedia et Bithorax de la drosophile (La signification de leur nomenclature est précisée dans la figure 11.5). Ces quatre séries de gènes sont considérées comme le produit de duplications géniques survenues à deux reprises chez un ancêtre des Vertébrés.

b) Les gènes paralogues

On appelle gènes paralogues chez les Vertébrés, les gènes Hox qui, résultant de duplications successives, sont situés au même niveau dans chacun des quatre complexes. 13 groupes de gènes paralogues sont ainsi distingués (fig. 11.5).

Au cours de l'évolution, des divergences limitées sont apparues dans leur séquence et notamment au niveau de leur homéoboîte. C'est ainsi que l'homologie des séquences entre les homéoboîtes des gènes *HOXA-4*, *B-4*, *C-4*, et *D-4* humains et *Deformed* de la drosophile est plus importante qu'entre la séquence de *Deformed* et n'importe quel autre homéoboîte des gènes de la drosophile. De même, chacune des homéoboîtes de ces 4 gènes humains a plus de similitudes avec celle de *Deformed* de la drosophile qu'avec tout autre gène homéotique humain. Un même degré de similitude existe à l'intérieur de tous les groupes de gènes paralogues.

On a montré que les homéoboîtes des gènes de drosophile et des gènes paralogues correspondants de Vertébrés avaient une similitude de fonction telle qu'ils pouvaient, en quelque sorte, se substituer l'un à l'autre (voir encart 11.3).

c) Pendant la gastrulation, les gènes homéotiques s'expriment en respectant le principe de colinéarité

Les domaines d'expression de ces gènes pendant la gastrulation, leur ordre chronologique d'activation et leur sensibilité aux agents inducteurs respectent la règle de colinéarité.



Une étude portant sur les gènes du groupe *Xhox 2* chez l'embryon de xénope illustre les modalités de l'expression de la gastrulation à la neurulation d'un groupe de 6 gènes homéotiques alignés sur un même chromosome (Dekker et coll., 1992).

Le gène *Xhox 2-9* exprimé dans la région antérieure de la tête est détecté le premier au début de la gastrulation, suivi de près, et sensiblement dans l'ordre, par les autres. De façon générale, leur période d'expression maximale se situe à la neurulation, elle décline durant le stade bourgeon caudal.

Les gènes du groupe réagissent ensemble mais inégalement à l'acide rétinoïque. S'il est administré à une dose de 1×10^{-6} M, de façon continue depuis le stade gastrula, il augmente massivement l'expression de ces six gènes (fig. 11.7), mais le taux d'activation n'est pas identique pour tous : il est plus important pour les gènes situés en 3' et s'exprimant dans la région céphalique que pour les gènes situés en 5'; cette variation de sensibilité est colinéaire avec l'ordre des gènes sur le chromosome. Le plan d'expression des gènes du complexe *Xhox 2* est donc perturbé de telle façon que la limite antérieure d'expression des gènes situés en 3' devient encore plus antérieure (le domaine de *Xhox 2-9* faisant exception) et que les gènes en 3' sont plus rapidement stimulés qu'en 5'. L'acide rétinoïque favorise donc le développement des structures postérieures.

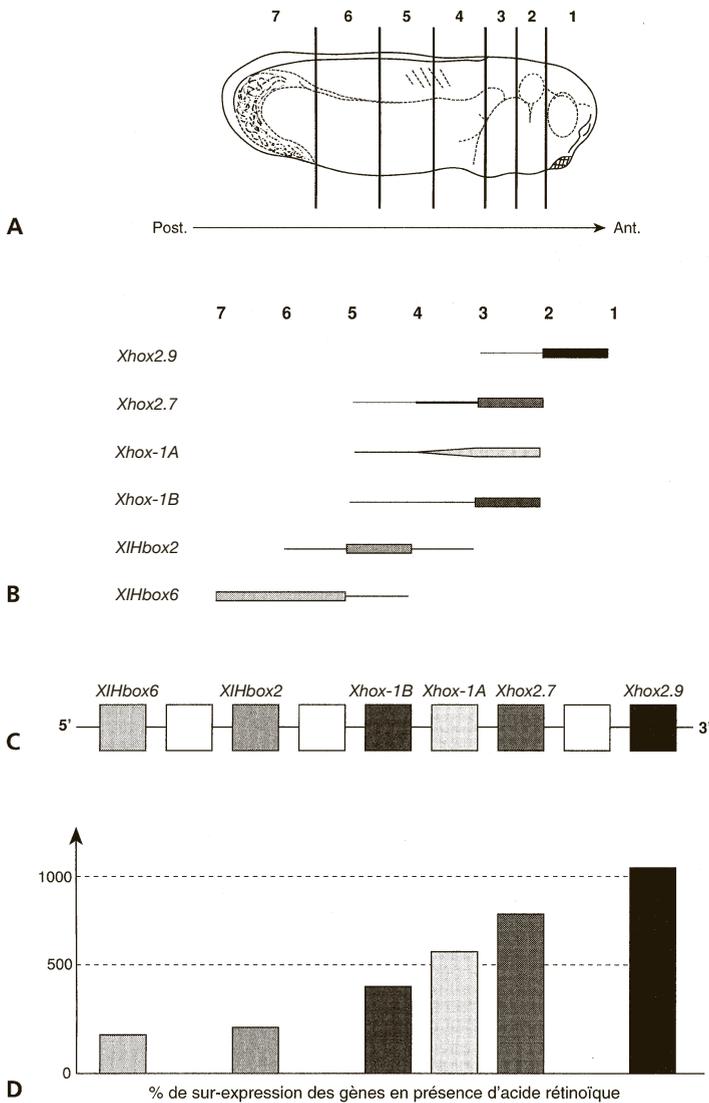


Figure 11.7 - Expression des gènes du complexe homéotique *Xhox 2*, chez le xénope, au stade du bourgeon caudal.

A : L'embryon est découpé en 7 régions dans le sens antéro-postérieur, pour y rechercher l'expression des gènes *Xhox 2*. **B** : Les ARN-m de 6 gènes sont identifiés, l'aire d'expression de chacun est limitée et spécifique. **C** : Carte des gènes *Xhox 2* : Le classement des gènes étudiés sur le chromosome, dans le sens 3' vers 5', correspond à l'ordre de leurs aires d'expression chez l'embryon, suivant l'axe antéro-postérieur. Les gènes en 3' s'expriment les premiers (non montré). **D** : La sensibilité des gènes à l'acide rétinoïque, qui en provoque une forte surexpression, est fonction de leur position sur le chromosome. (D'après Dekker et coll., 1992).



Expérience de MacGinnis montrant une similitude de fonctionnement entre les gènes paralogues

MacGinnis le démontre dans une expérience en utilisant la grande homologie qui existe entre les homéodomaines de la protéine *Deformed* de la drosophile et de *HOXB-4* humain : ils ne diffèrent que par 7 acides aminés. On sait que, chez le mutant *Deformed* de drosophile où ce gène s'exprime hors de ses limites naturelles, il y a notamment déformation des yeux auxquels il manque la moitié inférieure. L'auteur reproduit cette malformation lorsqu'il transfecte le gène humain *HOXB-4* dans des œufs de drosophile : ce gène s'exprime alors dans tout l'embryon, et la protéine régulatrice humaine correspondante sera synthétisée et présente dans tous les tissus. Cette opération provoque les mêmes malformations que la mutation *Deformed*. On peut, en simplifiant, conclure que cette protéine agit, au moins pour une partie des effets observés, comme une copie spécifique, quoique moins efficace, de la protéine *Deformed* de la drosophile.

Dans une seconde expérience, MacGinnis et coll. (1990), utilisent les protéines paralogues *Hoxb-6* et *Antennapedia*. Si le gène *HoxB-6* de la souris est transfecté dans l'œuf de la drosophile, la protéine régulatrice sera synthétisée dans tout l'embryon et par conséquent à un niveau plus antérieur que la normale. La larve aura, au niveau de la tête, des caractères morphologiques qui se trouvent normalement au niveau du thorax (types de soies, dessin de la cuticule). C'est la même anomalie qui se développe chez les embryons de mutants de drosophile pour le gène *Antennapedia* (en outre, chez l'adulte, la mutation s'exprime également au niveau de la tête en déterminant la formation de pattes au lieu d'antennes ; l'expérience décrite ici n'est pas allée jusqu'au stade adulte). Ici encore, un gène de souris a provoqué l'apparition de caractères qui s'observent lors de la mutation du gène paralogue de drosophile. Ces expériences montrent également que les homéodomaines assurent l'essentiel de la spécificité puisque les protéines de substitution n'ont en commun que cette région.

De semblables exemples respectant la règle de colinéarité dans l'expression d'un complexe de gènes, et leur sensibilité à l'acide rétinoïque existent pour d'autres espèces (poulet, souris), et pour d'autres groupes de gènes.

d) Domaine d'expression des gènes homéotiques au cours du développement embryonnaire (fig. 11.6)

Chez les Vertébrés, comme chez la drosophile, chaque gène homéotique possède un domaine d'expression défini avec une limite antérieure nette, qui est propre au gène examiné. Son degré d'expression n'est, en revanche, pas constant et diminue d'avant en arrière, jusqu'à pouvoir devenir nul, chaque gène étant le plus souvent inhibé par celui qui s'exprime plus postérieurement.

Actuellement, des mutations expérimentales ont été décrites pour 34 des 39 gènes *Hox* de la souris et on connaît pour la plupart d'entre eux, les conséquences de leur inactivation sur les différenciations de l'axe antéro-postérieur.

Chez la souris, la frontière antérieure d'expression de *Hoxa-4* se trouve au milieu¹ de la seconde pré-vertèbre, celle de *Hoxa-5* au milieu de la 3^e, celle de *Hoxa-6* au niveau de la 8^e. Si par hybridation *in situ* on utilise des sondes fluorescentes permettant de détecter les protéines régulatrices homéotiques correspondantes, on constate que, pour chacune d'elles, l'intensité de la fluorescence diminue de l'avant vers la queue. On peut ainsi parler de gènes antérieurs, moyens et postérieurs.

11.3.2 Expression de plusieurs gènes homéotiques dans la différenciation du rhombencéphale et des crêtes neurales

Les gènes homéotiques ne s'expriment pas, pour la plupart d'entre eux, dans une ébauche déterminée, mais à un certain niveau du corps où toutes les variétés de types cellulaires les expriment. Plusieurs gènes différents peuvent s'exprimer au même niveau d'une ébauche, chacun possédant cependant sa propre limite antérieure d'expression et son propre gradient. Ils sont exprimés à la fois dans les tissus inducteurs et dans les tissus cibles. Plus tard, lorsque la morphogenèse sera plus avancée, leur domaine d'expression peut devenir plus spécifique.

– **Le rhombencéphale est formé d'une succession de rhombomères et présente une combinaison de gènes Hox exprimés avec leurs limites propres le long de son axe antéro-postérieur.** Chez la neurula, on distingue dans le rhombencéphale, ébauche du cerveau postérieur, une succession de discrets renflements qui disparaissent après la différenciation des nerfs et des ganglions crâniens. Ce sont les **rhombomères**, au nombre maximum de 8. Les cellules de chaque rhombomère participent à des formations bien définies : elles conservent une mémoire de leur rhombomère d'origine et ne sont pas interchangeables. Des nerfs crâniens se différencient à partir des rhombomères pairs : le nerf trijumeau à partir du 2^e, le nerf facial et acoustique à partir du 4^e, et le glossopharyngien à partir du 6^e (fig. 11.8).

Des gènes organisateurs spécifiques de chacune des grandes régions de l'encéphale, comme les gènes *Hoxb*, sont transcrits pendant la morphogenèse, avec des limites antérieures d'expression très nettes (Hunt et coll., 1991). Ils sont exprimés dans les rhombomères, le tube neural et les cellules des crêtes neurales. Quand celles-ci migrent et quand leurs dérivés (voir § 8.5.lc) gagnent leur emplacement définitif, il s'y exprime les mêmes gènes que dans le rhombomère d'origine (fig. 11.8) ; les ganglions crâniens et rachidiens, les nerfs sensoriels correspondants, les mélanocytes de la peau, des éléments du squelette et de la musculature faciale issus des crêtes neurales d'un même rhombomère ont le même équipement.



La limite antérieure d'expression de chaque gène *Hoxb* est très nette et se situe deux rhombomères en arrière de la limite d'expression du gène *Hox* qui le précède (fig. 11.6).

1. Cette limite correspond à celle d'un métamère. Chaque vertèbre se forme en effet à cheval sur deux métamères. Les gènes régulateurs qui s'expriment dans ces deux moitiés sont différents; de ce fait, la vertèbre est polarisée.

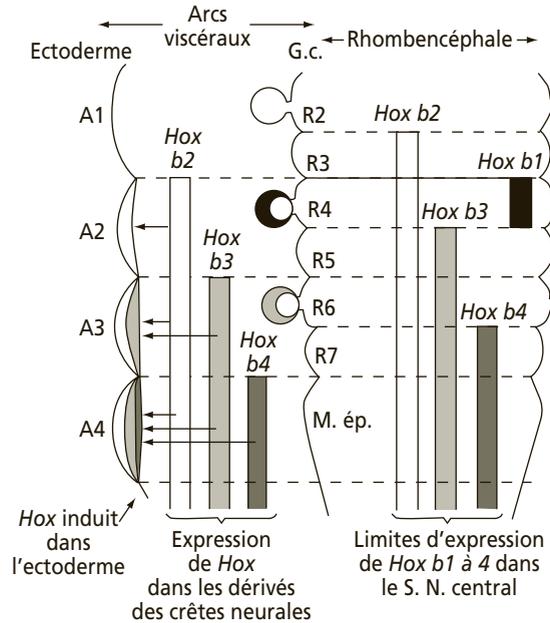


Figure 11.8 - Expression des gènes *Hoxb-1* à *Hoxb-4* chez la souris dans les rhombomères, les dérivés de leurs crêtes neurales (ganglions crâniens et arcs viscéraux), et l'ectoderme au contact de ceux-ci.

Noter le décalage entre les limites antérieures d'expression des gènes dans le rhombencéphale et dans les dérivés des cellules des crêtes neurales lié au trajet de migration de celles-ci ; *Hoxb-1* fait exception à la règle. A1 à A4 : arcs viscéraux, G. c. : ganglion crânien, M. ép. : moelle épinière. R2 à R7 : rhombomères (d'après Mc Ginnis et Krumlauf, 1992, modifié).

Par exemple, dans le tube neural, la limite d'expression de *Hoxb-2* est au niveau antérieur du rhombomère 3 (R3), celle de *Hoxb-3* du R5, celle de *Hoxb-4* du R7. Seul *Hoxb-1* ne répond pas à cette règle. Les limites postérieures d'expression sont quant à elles beaucoup moins nettes, les intensités d'expression diminuent d'avant vers l'arrière le long du tube neural comme on a pu déjà le voir plus haut (fig. 11.6). Des études de l'expression des gènes des 4 séries paralogues *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* et *Hoxd* dans la différenciation du squelette axial montrent le même type de limites d'expression : nette vers l'avant, progressive vers l'arrière et la combinaison d'activité de plusieurs gènes sur un même niveau.

- Les gènes Hox ne s'expriment pas dans les crêtes neurales du télencéphale et du diencéphale qui se différencient en éléments du squelette du crâne et de la face. Le tube neural et les crêtes neurales au niveau du télencéphale et du diencéphale n'expriment pas de gènes Hox. Les crêtes neurales de cette région antérieure formeront les os d'une partie de la boîte crânienne, des mâchoires supérieures et des mandibules. En revanche, le squelette des branchies ou de l'os hyoïde sont des dérivés des crêtes neurales du rhombencéphale où s'expriment des gènes Hox. Si on provoque une mutation nulle (ou mutation « knock-out ») chez l'embryon de souris de telle façon que le gène *Hoxa-2* ne s'exprime plus dans les

crêtes neurales qui fournissent le deuxième arc branchial, ce second arc, au lieu de former l'os hyoïde, donnera une seconde mandibule.

- **Un même gène est exprimé dans l'inducteur et le tissu cible.** L'expression simultanée des mêmes gènes actifs dans le tissu inducteur et le tissu cible (voir l'étude de ces notions au chapitre 15) a été montrée dans plusieurs espèces pour différents types de gènes et dans différentes régions de l'embryon. Chez la souris, le gène *Hoxb-9* apparaît d'abord dans des cellules du mésoderme qui, au stade de la gastrula âgée, migrent au niveau du cerveau postérieur. À partir du stade neurula, cette région du neurectoderme exprimera également *Hoxb-9* et les limites antérieures d'expression du gène coïncident dans le mésoderme et le neurectoderme. Le gène homéotique exprimé dans le mésoderme aurait induit cette même expression dans le neurectoderme (Frohman et coll., 1990). Ce même gène s'exprime aussi dans les composants ectodermiques, mésodermiques et endodermiques des futurs arcs branchiaux et des poches branchiales avec, là encore, une concordance entre ses limites d'expression dans les différents territoires.

Les dérivés des crêtes neurales induisent, dans les cellules ectodermiques ou mésodermiques qui sont à leur contact, l'expression des gènes *Hoxb* du rhombomère d'origine. C'est suivant cette programmation que se différencie par exemple les arcs branchiaux, les mandibules ainsi que leur innervation et leur musculature. Aussi, une anomalie du fonctionnement d'un de ces gènes provoquera-t-elle des malformations multiples dans les dérivés du même rhombomère.

Les gènes régulateurs assureraient entre autres fonctions un rôle de coordination. Ils pourraient réguler, en même temps, l'expression d'un gène codant pour une protéine inductrice dans les tissus inducteurs et, dans les cellules cibles, l'expression de gènes codant pour les récepteurs à ces inducteurs. Ils pourraient ainsi coordonner, par toute une cascade de régulations, la capacité d'induction d'un tissu et la compétence de son partenaire. Dans cette perspective, c'est une chaîne de gènes régulateurs qui serait concernée à un moment d'une organogenèse donnée, et non un seul gène régulateur homéotique.

11.3.3 La modification du domaine d'expression d'un gène modifie l'identité de l'organe qui s'y différencie

L'identité d'un organe et sa position au sein de l'organisme, le long de l'axe antéro-postérieur du corps, sont définies par les gènes homéotiques qui s'expriment chez le jeune embryon (voir encart 11.4). Une modification dans leurs limites d'expression change la nature de l'organe qui se différencie.

a) Emploi expérimental de souris transgéniques

Par exemple, la protéine *Hoxa-7* n'est normalement présente que dans les régions cervicales postérieure et thoracique antérieure. On étudie une lignée de souris transgéniques qui produisent cette protéine de façon anormale au niveau de la tête et de la région cervicale antérieure. Ces animaux présentent des anomalies dans l'oreille interne, le palais, les vertèbres cervicales ; le thymus, un dérivé de l'épithélium des

Les gènes *Hox* contrôlent toutes les organogenèses

- **Les régions du tube digestif** se différencient suivant un plan contrôlé par les gènes *Hox*. On peut citer parmi eux *Hoxc4*, de niveau d'expression antérieure ; sa mutation est responsable de la malformation de la couche musculaire œsophagienne, interdisant une alimentation normale. Des mutations de *Hoxd-12* et *HoxD-13* dans la région postérieure du tronc sont responsables de malformations des couches musculaires du rectum. D'autres mutations provoquent seulement des dysfonctionnements, sans anomalies morphologiques, comme celles qui affectent *Hoxa-5*, qui participe au programme de différenciation des cellules de l'épithélium intestinal ; les capacités digestives de l'embryon sont atteintes. Il est intéressant à noter que le gène homologue de la drosophile, *scr* (*sex combs reduced*), est aussi impliqué dans l'organisation du tube digestif moyen de l'insecte.
- **Les glandes thyroïde, parathyroïdes et le thymus** se développent à partir d'ébauches endodermiques et mésodermiques qui se trouvent sur les arcs branchiaux. C'est le domaine d'expression de *Hoxa-1* et *Hoxb-1* à *Hoxa-3* et *Hoxb-3*. Des mutations de ces gènes provoquent, outre des anomalies du squelette au niveau du cou, des malformations glandulaires parfois létales. Dans le cas, par exemple, de la mutation *Hoxa3*^{-/-}, un gène fortement exprimé dans les ébauches des parathyroïdes et du thymus, ainsi que dans le plancher pharyngien où se différencie la thyroïde, ces organes sont atrophiés ou absents.

arcs viscéraux est absent. Il se forme par contre des structures qui se développent normalement dans des régions plus postérieures : par exemple formation de côtes au niveau du cou (Gruss et coll., 1991).

b) Modification de l'expression des gènes *Hox* par l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque provoque l'expression de certains gènes *Hox* dans des cellules à des niveaux où ils ne s'expriment pas naturellement (Kessel, 1992). On l'utilise dans de nombreuses expériences qui permettent d'établir une relation entre l'expression d'un gène à un niveau anormal et la structure inhabituelle qui s'y développe. De façon générale, l'excès d'acide rétinoïque exogène déplace vers l'avant la limite d'expression des gènes homéotiques les plus antérieurs, (**transformation antérieure**) et repousse vers l'arrière la limite d'expression des gènes homéotiques postérieurs, (**transformation postérieure**). Par exemple, de l'acide rétinoïque administré *in utero* à des embryons de souris de 8 jours (en cours de gastrulation), provoque une expression du gène *Hoxa-10* en arrière de la zone normale, d'où un déplacement de la limite des formations thoraciques : des côtes se développent sur la première vertèbre lombaire. Si, dans ces expériences, les gènes *Hox* postérieurs à *Hoxa-10* ne s'expriment pas, c'est toute la partie postérieure de l'embryon qui fait défaut. Ces résultats font penser que, dans les conditions naturelles, l'acide rétinoïque régule l'expression des gènes homéotiques et joue un rôle dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur (voir aussi § 15.4.2d).

c) Malformations liées à l'élimination de gènes régulateurs homéotiques

Lorsque dans une lignée de souris transgéniques des gènes homéotiques ne s'expriment pas, il en résulte des malformations dans les régions où ce gène s'exprime normalement. Sur le territoire d'expression normal du gène manquant, c'est le gène immédiatement antérieur qui s'exprime puisqu'il n'a pas rencontré son inhibiteur postérieur habituel, ce qui correspond à une transformation antérieure.

Par exemple, l'inactivation du gène *Hoxc-8* qui s'exprime normalement dans les régions thoracique et caudale de l'embryon, entraîne une transformation au niveau des vertèbres, de la 7^e thoracique jusqu'à la 1^{ère} lombaire, chacune d'elles prenant l'aspect de la vertèbre immédiatement antérieure.

d) Chronologie de l'expression des gènes homéotiques

Les gènes homéotiques aux limites d'expression les plus antérieures sont activés avant les gènes à limite d'expression postérieure. Cette succession suit en cela le sens de la différenciation embryonnaire qui est d'autant plus tardive qu'on se déplace de l'avant vers l'arrière de l'embryon (ce qui est par exemple très visible dans le développement de l'embryon de poulet, voir fig. 9.8).

Ainsi, la règle de colinéarité s'applique selon une dimension spatio-temporelle, et non pas uniquement spatiale, les gènes en 3' s'exprimant plus précocement que ceux situés en 5'.

11.3.4 Les gènes sélecteurs homéotiques dans la différenciation d'organes polarisés : les membres des Vertébrés (fig. 11.9)

Ces gènes continuent de s'exprimer plus tard dans l'embryogenèse comme c'est le cas au cours de la différenciation des membres, formations aux axes bien définis : axe proximo-distal (épaule → doigts), antéro-postérieur (pouce → auriculaire), dorso-ventral (dos → paume de la main).

a) Formation de l'ébauche de membre

La position des membres des Vertébrés le long de l'axe antéro-postérieur du corps est liée aux zones d'expression des gènes Hox ; celles-ci sont indépendantes du nombre de vertèbres ou de somites de l'espèce considérée. Ainsi, qu'il s'agisse d'un membre ptérygien (nageoire pectorale de Poisson), ou de membres chirodiens de Tétrapodes (patte, aile ou bras), les membres antérieurs se différencient à un niveau du tronc correspondant à la limite d'expression la plus antérieure commune aux gènes *Hoxb-8* (fig. 11.9) et *Hoxc-6* ; les membres postérieurs se forment quant à eux à la limite antérieure de *Hoxc-9*.

La présence d'acide rétinoïque semble nécessaire pour que s'amorce la formation des membres. On a montré, chez l'embryon de poulet, qu'il ne se forme aucun bourgeon de membre si sa synthèse est inhibée (Stratford et coll., 1996). L'acide rétinoïque serait synthétisé au niveau du nœud de Hensen et distribué suivant un gradient de concentration antéro-postérieur ; il activerait l'expression de certains

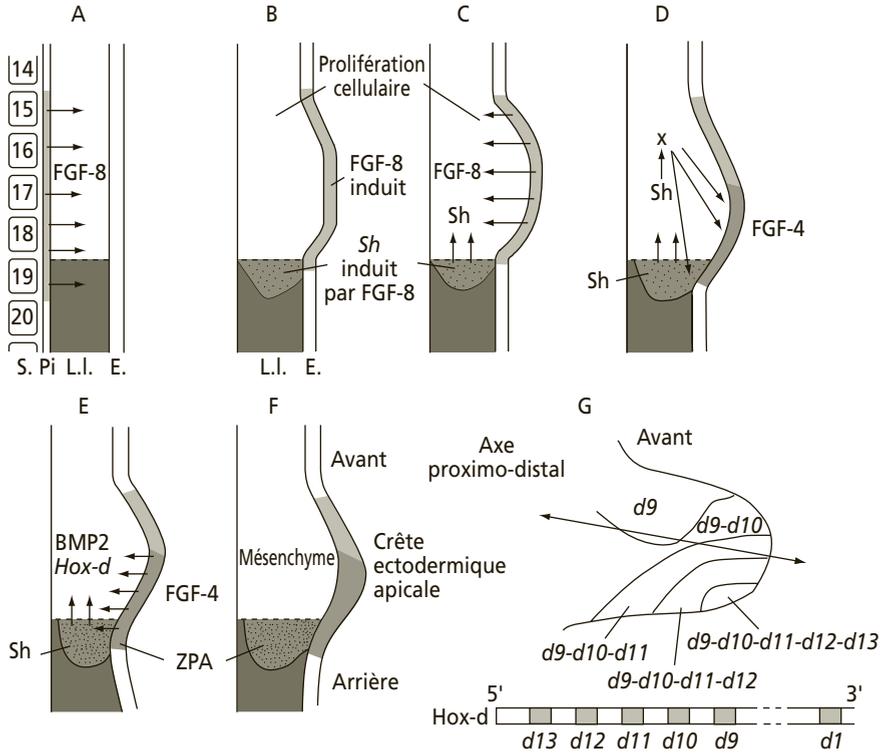


Figure 11.9 - Expression de gènes sélecteurs homéotiques et de facteurs de croissance pendant la différenciation d'un bourgeon de membre antérieur

A : À l'avant de la limite antérieure du domaine d'expression de *Hoxb-8* (niveau du 19^e somite chez l'oiseau), *FGF10* qui était auparavant présent dans tout le mésoderme latéral a restreint son aire d'expression au niveau de la future ébauche de membre sous l'action stabilisatrice de *Wnt2b* et de *FGF8* sécrété par les pièces intermédiaires.

B : Au sein de l'ébauche, *FGF10* induit la synthèse de *FGF8* dans l'ectoderme qui forme une crête ectodermique, par l'intermédiaire d'une voie Wnt (*Wnt3*). À son tour *FGF8* stimule la production de *FGF10*, et la prolifération cellulaire dans le mésenchyme.

C : À la limite postérieure du bourgeon de membre, *FGF8* induit dans le mésenchyme l'apparition d'une zone sécrétrice de *Sonic hedgehog* (*Shh*) : la ZPA (« Zone of polarizing activity »).

D : La crête ectodermique sécrète un nouveau facteur : *FGF4*. Les *FGF* stimulent conjointement les mitoses et assurent la stabilité de la sécrétion de *Shh* ; en retour, *Shh*, par des intermédiaires complexes, maintient la production de *FGF4*.

E : *FGF4* sécrété par la crête ectodermique apicale et *Shh* par la ZPA induisent dans le mésenchyme du bourgeon la synthèse d'un *TGF-β*, *BMP-2*, et l'expression des gènes *Hoxd*.

F : Bourgeon de membre polarisé. Le mésenchyme prolifère et exprime les gènes *Hox-9* à *13*.

G : Domaines d'expression des gènes du complexe *Hoxd* dans un bourgeon de patte d'embryon de poulet. Le plus grand nombre est exprimé dans la zone apicale postérieure. En allant vers la paroi du tronc, le nombre des gènes exprimés se réduit en suivant l'ordre dans lequel ils sont disposés sur le chromosome. Le gène *Hox-9*, seul à être présent près du tronc a aussi été le premier exprimé et se retrouve à tous les niveaux. Apparaissent ensuite, et successivement, *Hoxd-10* à *d-13*. E : Ectoderme ; L.I. : lame latérale ; Pi : Pièce intermédiaire ; S : Somite.

gènes *Hox* dans les cellules qui seraient ainsi destinées à participer à l'édification des bourgeons de membres.

Ceux-ci se présentent d'abord comme des expansions latérales du tronc. Les cellules mésodermiques qui y prolifèrent proviennent des somites (futures cellules musculaires) et de la somatopleure des lames latérales (futures cellules du squelette). L'amorce du développement de ces ébauches est induite par la sécrétion d'un FGF : FGF10. Ce facteur est initialement présent dans tout le territoire du mésoderme des lames latérales avant l'induction des bourgeons de membres puis l'expression de FGF10, immédiatement avant leur apparition, se restreint à leurs aires de développement. Cette restriction serait due à l'action de deux protéines Wnt : Wnt2b pour les membres antérieurs et Wnt8c pour les membres postérieurs ; elles y stabiliseraient l'expression de *FGF10* (Kawakami et coll., 2001). L'expression des gènes *Wnt* serait à son tour stabilisée grâce à un FGF (FGF8), synthétisé et sécrété par le mésoderme des pièces intermédiaires. Des données expérimentales et des observations tératologiques montrent en effet un lien entre des anomalies du développement des structures néphrétiques issues des pièces intermédiaires et celles des membres. Le facteur de croissance FGF10 de l'ébauche induit la formation d'une **crête ectodermique apicale** à la frontière entre l'ectoderme dorsal et l'ectoderme ventral, et la synthèse de FGF8 dans l'ectoderme de cette crête par une voie impliquant Wnt3. Le FGF-8 stimule en retour la multiplication des cellules du mésenchyme sous-jacent à la crête et celles-ci constituent une zone de croissance et de sécrétion de FGF10. La crête ectodermique sécrète à son tour des FGF (FGF4) vers le mésenchyme. Le bourgeon de membre se développe alors dans le sens proximo-distal ; si l'on considère le membre antérieur, les ébauches du bras et de l'humérus sont en place les premières, suivies de celles de l'avant-bras, avec radius et cubitus, du poignet et de la main avec métacarpe, carpe et phalanges. L'axe dorso-ventral est déterminé par l'expression de *Wnt7a* qui se situe exclusivement dans l'ectoderme dorsal du bourgeon de membre. La protéine Wnt7a induit la dorsalisation du mésenchyme sous-jacent.

Cette ébauche est donc très tôt polarisée dans les trois directions proximo-distale, antéro-postérieure et dorso-ventrale.

b) Détermination des membres antérieurs et postérieurs

Bien que les membres antérieurs et postérieurs aient de fortes homologies, ils présentent des différences qui sont évidentes. Celles-ci sont fixées très tôt et ce sont des gènes de la famille *Brachyury* (ou gènes *Tbx*), qui contrôlent leur différenciation (voir § 11.1.1b). On a montré que *Tbx5* et *Tbx4* s'expriment respectivement dans les aires des membres antérieurs et des membres postérieurs (Gibson et Brown, 1996). Si, par exemple, on fait s'exprimer *Tbx4* dans l'aire du membre antérieur, un membre surnuméraire se forme de type patte postérieure.

c) Activation de gènes de polarité au cours du développement de la patte

- *L'axe antéro-postérieur* est déterminé, lorsque le bourgeon de membre apparaît, par une petite région du mésoderme située dans l'aire d'expression de *Hoxb-8*, à la limite postérieure de la jonction entre le jeune bourgeon et la paroi du corps.

Cette zone est appelée **Zone à activité polarisante** ou **ZPA** pour « **Zone of Polarizing Activity** » (fig. 11.9). Si on la transplante sur la face antérieure d'une autre ébauche de membre, il se forme un membre double dont l'élément surnuméraire présente une orientation antéro-postérieure inverse de celle du membre normal.

- *La protéine active de ZPA est le produit du gène sonic hedgehog* homologue du gène de polarité segmentaire *hedgehog* de la drosophile. La protéine a été localisée chez l'embryon de poulet à l'emplacement des aires où l'activité ZPA est maximale (Riddle et coll., 1993). Son rôle est démontré expérimentalement : des fibroblastes ont été transfectés avec le gène *sonic hedgehog* combiné à un vecteur d'expression; ces cellules, devenues capables de synthétiser la protéine régulatrice, sont implantées dans la région antérieure du membre, symétriquement à ZPA ; il s'y forme des éléments de membre surnuméraire en polarité inversée, comme après un transplant de ZPA.

L'expression du gène *sonic hedgehog* et la synthèse de la protéine sont induites par le FGF8 émis par la crête apicale. *Sonic hedgehog* n'est exprimé que dans les cellules de l'aire postérieure du mésenchyme du bourgeon qui seules répondent à l'induction de FGF8. D'après une étude réalisée sur le membre antérieur d'embryon de poulet, il semble que la protéine Hoxb-8 qui ne s'exprime que dans la partie caudale du bourgeon, sensibilise au FGF8 les cellules qui s'y trouvent. En effet, si on amène expérimentalement *Hoxb-8* à s'exprimer en une position ectopique, il y détermine la formation d'une nouvelle ZPA.

La protéine Sonic hedgehog (Shh) induit alors, par une série de facteurs intermédiaires encore inconnus, d'une part au sein du mésenchyme la synthèse des protéines BMP2 et BMP7, molécules appartenant à la famille des TGF- β et, d'autre part, la synthèse de FGF4 dans l'ectoderme de la crête apicale où elle s'ajoute à celle de FGF8. Il se forme un gradient de concentration de ces substances depuis la face postérieure du membre vers la face antérieure et la réponse des cellules cibles serait alors l'expression des gènes *Hoxa* et *Hoxd*, en fonction des différentes concentrations (voir *infra* d).

L'activité de Sonic hedgehog amorce une série d'interactions cellulaires aboutissant à l'identité des doigts ayant chacun leurs propres caractéristiques. La protéine met en jeu une série de facteurs de transcription. Les ébauches des doigts 5 à 2 sont déterminées en présence d'une action décroissante de Shh, le doigt 1 n'y étant pas soumis. Shh agirait par l'intermédiaire de protéines BMP dont les cibles seraient les aires interdigitales vouées à une prochaine apoptose. *Sonic hedgehog* contrôle la polarité antéro-postérieure dans l'ébauche de membre dans les mêmes conditions que *hedgehog* dans l'aile de drosophile. En effet, chez cet insecte, la protéine Hedgehog est aussi synthétisée dans la partie postérieure des disques imaginaires de pattes et d'ailes dont elle définit l'axe antéro-postérieur. Si on la fait s'exprimer dans la partie antérieure, on obtient une aile avec deux faces postérieures en miroir.

- *L'axe dorso-ventral* d'un membre résulte de l'affrontement de deux territoires ectodermiques, dorsal et ventral. Les deux populations de cellules qui les composent se rencontrent dans la crête apicale sans subir aucun mélange. Des modifications de la frontière qui les sépare provoquent des anomalies de développement. On n'a pas encore identifié le gène dont l'expression est à l'origine de la distinction entre les

aires dorsale et ventrale. On a constaté des différences entre ces territoires quant à l'expression de certains gènes organisateurs. La plus nette concerne le domaine du facteur de transcription Enl. C'est le produit d'un gène homologue du gène *engrailed* de la drosophile chez qui il ne s'exprime que dans les compartiments postérieurs des ébauches d'aile; chez l'embryon de poulet, il ne s'exprime que dans l'ectoderme ventral. Dans les lignées où le gène codant pour Enl est inactif, la polarité dorso-ventrale du membre est défectueuse; d'autre part, une expression ectopique du gène, c'est-à-dire hors de son territoire habituel, entraîne des anomalies dans la formation de la crête apicale, et aboutit à un membre incomplet.

Un autre exemple est fourni par le gène *Wnt7a* qui n'est exprimé que dans l'ectoderme dorsal de la patte de souris et de poulet. Sa délétion chez la souris entraîne la formation d'une patte à double face ventrale. *Wnt7a* active la synthèse d'un facteur de transcription, *Lmx1*, dans le mésenchyme dorsal. Si sa synthèse est induite expérimentalement dans le mésenchyme ventral, il s'y forme des structures dorsales. De même, des mutations affectant *Lmx1* chez l'homme et chez la souris perturbent la polarité dorso-ventrale des membres.

d) Implication des gènes homéotiques des complexes Hox dans les polarités antéro-postérieure et proximo-distale des membres (fig. 11.9)

- *L'axe proximo-distal du membre en développement est sous la dépendance de l'expression de gènes Hox* identiques à ceux qui sont activés le long de l'axe céphalo-caudal au début de la morphogenèse (Dollé, 1989, Yokouchi, 1991). L'expression des gènes paralogues 9 à 13 de *Hoxa* et *Hoxd* a été étudiée notamment chez la souris et l'embryon de poulet.

Nous ne considérerons que le complexe *Hoxd*. On peut constater que la règle de colinéarité est respectée. Les gènes en position 5' ne sont exprimés que dans les parties les plus distales de l'ébauche, c'est-à-dire celles qui se différencient le plus tardivement alors que les gènes qui se trouvent en position 3' dans le complexe s'expriment dès le début de la formation du bourgeon et continuent à s'exprimer dans sa totalité (fig. 11.9G). On observe aussi une asymétrie antéro-postérieure dans leur aire d'expression, qui correspond à une polarité antéro-postérieure du membre : pour le membre antérieur, la partie antérieure correspond au pouce, et n'exprime que *Hoxd-9* et *-10*, la partie postérieure correspondant au petit doigt exprime *Hoxd-9* à *13* ; des modifications expérimentales dans le plan d'expression de ces gènes entraînent d'ailleurs des anomalies dans l'identification des doigts. Au fur et à mesure que l'ébauche croît, ces gènes homéotiques vont progressivement restreindre leur domaine d'expression aux ébauches du squelette.

Le dernier gène du complexe *Hoxd-13* a particulièrement été étudié (Dollé et coll., 1993). Chez un animal normal, ce gène s'exprime dans la région abdominale et dans le membre postérieur, où il ne s'exprime qu'à l'extrémité de la patte. On observe que des souris mutantes avec *Hoxd-13* déficient, présentent des altérations du squelette et des organes de la région abdominale, c'est-à-dire des parties postérieures du corps, mais aussi des altérations des extrémités du membre : réduction en

nombre et en taille des phalanges. Il est à noter que, chez l'homme, une corrélation a pu être établie entre des mutations subtiles portant sur *Hoxd-13* et l'apparition d'une synpodactylie (polydactylie distale) associée à une soudure des doigts 2 et 3.

● **ZPA et la crête apicale sont toutes deux indispensables au développement d'un membre** ; elles collaborent par leurs synthèses à la croissance et à l'activation des gènes *Hoxd*. En l'absence de crête apicale, les régions distales du membre ne se différencient pas. La protéine Sonic hedgehog ne peut à elle seule induire l'expression de l'ensemble des gènes *Hoxd*. Les gènes *Hoxd-12* et *-13* ne sont induits qu'en présence de la crête apicale ou, expérimentalement, d'acide rétinoïque, mais à des concentrations plus élevées que la concentration physiologique. Nous avons vu que Sonic hedgehog agit en induisant indirectement la synthèse de FGF4 dans la crête apicale et de BMP-2 dans la zone de croissance. Les produits de la crête apicale et de ZPA activent mutuellement leurs synthèses pour collaborer au maintien de la prolifération cellulaire et à l'activation de la totalité des gènes *Hoxd-9* à *13*.

11.3.5 Autres gènes organisateurs régionaux des Vertébrés, apparentés aux gènes de la drosophile

a) Les gènes *Pitx* et *Otx*, de la famille bicôïd

On a identifié récemment de nouveaux facteurs de transcription dont un des rôles essentiels semble être de définir, au niveau moléculaire, l'identité de grands territoires embryonnaires. Certains appartiennent à la famille des homéogènes *paired* (voir tableau 11.2), comme les gènes *Pitx*, *Otx*, dont la spécificité de reconnaissance de leurs produits à l'ADN est semblable à celle du facteur Bicoïd de la drosophile.

De même que *bicoïd* a un rôle essentiel dans la détermination de la partie antérieure de l'embryon de drosophile, de même *Otx2* est impliqué, en collaboration avec un autre gène (*Lim1-Lhx1*), dans l'organisation de la tête. Son expression est limitée au niveau de structures précordales antérieures à la limite du domaine d'expression des gènes *Hox* qui participent à l'organisation du rhombencéphale. Chez des souris porteuses d'un gène mutant, les régions du cerveau antérieur et moyen sont manquantes.

Un autre membre de la famille des gènes *bicoïd*, *Pitx1* est exprimé au niveau du mésoderme latéral de la partie postérieure de l'embryon qu'il contribue à définir. C'est ainsi qu'il interviendrait, avec d'autres gènes proches de *Brachyury* (voir § 15.3.4), au niveau des membres postérieurs. En effet, l'inactivation de ce gène chez la souris modifie le développement du squelette des pattes arrières qui acquiert ainsi certains caractères du squelette des pattes antérieures.

Le gène *Pitx2* a aussi une expression régionale et contribue à organiser l'asymétrie de l'embryon (voir § 15.7).

b) Les gènes *Pax*, de la famille des gènes de segmentation *paired* de la drosophile

Ces gènes ont été identifiés chez des Vertébrés et des Invertébrés (voir § 11.1.1a). On a actuellement identifié 9 de ces gènes chez les Vertébrés (*Pax1* à *Pax9*). Ils sont exprimés dans le système nerveux et le mésoderme para-axial au cours du dévelop-

pement de la souris suivant une distribution dorso-ventrale. Dans le mésoderme para-axial, leur expression correspond à une régionalisation à l'intérieur des somites, *Pax1*, ventral est restreint aux sclérotomes, *Pax 3*, *Pax7* et *Pax9* aux myotomes.

On a établi chez l'humain une relation entre des mutations au sein de gènes *Pax* et des anomalies dans le développement de certains organes, preuve indirecte de leur rôle dans la morphogenèse. Des travaux réalisés sur des souris transgéniques ou victimes de mutations naturelles ont montré que les gènes *Pax* sont des régulateurs essentiels dont les différentes mutations affectent le déroulement de diverses organogenèses (*Pax2* et la formation du métanéphros, *Pax4* et la différenciation des cellules β du pancréas, *Pax7* et les cellules satellites des muscles, *Pax8* et la différenciation des pronéphros et mésonéphros). Chez les mutants, on observe une réduction de la taille ou même l'absence de l'organe pour lequel le gène défectueux s'exprime, ce qui indiquerait une intervention précoce dans le développement.

Il n'existe pas actuellement d'interprétation générale du fonctionnement des gènes *Pax*. Ils agissent tôt puis à différentes étapes du développement. Dans toute organogenèse il existe une série d'interactions entre l'élément épithélial et l'élément mésenchymateux de l'ébauche qui sont autant d'inductions secondaires ; lorsqu'un gène *Pax* muté est impliqué, ces interactions se déroulent de façon anormale. Ils interviennent aussi dans la prolifération rapide des cellules d'une ébauche ; leur déficience diminue cette prolifération, ce qui entraîne la formation d'un organe de taille réduite.

Le rôle que peuvent jouer les gènes *Pax* dans la détermination précoce de lignées cellulaires ou dans une organogenèse est illustré par l'étude de *Pax6* lors de la formation de l'œil (voir § 15.8.3).

Résumé

En 1969, Wolpert a établi une théorie d'après laquelle chaque cellule était informée de sa position dans l'embryon et avait en mémoire ses coordonnées le long des axes de polarité de l'organisme. Cette notion d'**information de position** trouve un support avec la découverte des gènes de polarité, de segmentation et des gènes homéotiques.

Chez la drosophile, l'activité d'une succession de gènes dont certains étaient actifs dès l'ovogenèse établit, au sein de l'œuf, dans l'embryon à l'état syncytial et dans le blastoderme, un plan d'organisation avec une succession d'étapes de plus en plus précises allant des axes de symétrie jusqu'aux détails de l'organisation d'un métamère.

Parmi ces gènes, il convient de souligner l'importance des gènes homéotiques, responsables de la spécification des identités phénotypiques corporelles.

Ces gènes sélecteurs homéotiques sont alignés sur un chromosome, dans l'ordre dans lequel ils s'expriment en suivant l'axe antéro-postérieur de l'organisme. Cette règle dite de colinéarité a été vérifiée chez les Arthropodes, les Vers métamérisés, les Vers plats, les Nématodes dont l'espèce *Cænorhabditis elegans* est un autre modèle de laboratoire pour l'étude des gènes homéotiques. Elle s'applique aussi aux Vertébrés avec leurs 4 séries de gènes paralogues.

Résumé

Ces gènes sont restés remarquablement stables depuis que ces différents groupes ont divergé à partir d'ancêtres communs, il y a près de 600 millions d'années au Précambrien. Leur bon fonctionnement apparaît comme un impératif absolu pour l'établissement d'un plan de développement et d'une mémoire de position des cellules le long des axes de polarité de l'embryon : la polarité céphalo-caudale mais aussi la polarité disto-proximale des membres.

Chez la drosophile, on sait que ce sont les gènes de polarité et de segmentation qui créent au sein d'une organisation syncytiale les conditions d'activation des gènes homéotiques.

Chez les Vertébrés, on connaît encore peu de choses sur les mécanismes d'activation des gènes homéotiques au début du développement (voir chap. 15). Les facteurs de croissance y jouent un rôle important, comme nous l'avons déjà constaté dans la différenciation des membres. D'autres familles de gènes stables, régulateurs de mécanismes de différenciation sont actuellement connues. Des gènes proches de *bicoïd* (*Pitx*, *Otx*), des gènes Pax, homologues des gènes *paired* de la drosophile, contrôlent la régionalisation du corps, la différenciation d'organes, comme le montrera l'étude de l'asymétrie gauche-droite et de la formation de l'œil.

La compréhension des mécanismes du développement embryonnaire a progressé grâce à ces travaux et des modèles applicables à tous les Vertébrés, voire à tous les Métazoaires, pourraient être proposés. La génétique du développement permet aussi une approche nouvelle et fructueuse des processus évolutifs comme ceux qui ont présidé à l'apparition et aux modifications des membres chez les Vertébrés ou des appendices chez les Arthropodes. Les liens entre l'embryologie, l'anatomie comparée et l'étude de l'évolution en sont resserrés et sont à l'origine d'une discipline nouvelle désignée sous le terme « Evo-Dévo ».

Par ailleurs, on peut penser que la connaissance des gènes homéotiques contribuera à la compréhension de certaines malformations, quelquefois héréditaires qui affectent un secteur du corps. C'est ainsi, par exemple, qu'on sait que des malformations de la face et du cou, liées à des malformations cérébrales, résultent d'un dysfonctionnement de gènes Hox, ce qui affecte à la fois les cellules du système nerveux central au niveau d'un rhombomère et les cellules dérivées des crêtes neurales correspondantes, issues du même niveau.

Questions

- 11.1** Qu'appelle-t-on gènes à effet maternel ?
- 11.2** Dans quelle séquence les gènes de segmentation se succèdent-ils chez la drosophile ?
- 11.3** Définissez les termes de gènes homéotiques et homéogènes
- 11.4** Citez des systèmes moléculaires impliqués dans des interactions de type juxtacrine
- 11.5** Quelle différence d'origine existe-t-il entre cellules nourricières et cellules folliculeuses chez les Insectes ?
- 11.6** Les cellules folliculeuses jouent-elles un rôle dans la mise en place des axes de polarité chez la drosophile ?
- 11.7** Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la mise en place des segments à partir de l'organisation parasegmentaire de l'embryon de drosophile ?
- 11.8** Qu'appelle-t-on règle de colinéarité ?
- 11.9** Qu'appelle-t-on gènes paralogues ?
- 11.10** Quel est le rôle de la zone à activité polarisante dans la formation d'un membre de Tétrapode ?

Réponses page 388

ANALYSE DE LA SEGMENTATION

PLAN

- 12.1 Activité mitotique pendant la segmentation
- 12.2 Localisations embryonnaires résultant de la segmentation
- 12.3 Œufs à régulation et détermination des territoires
- 12.4 Premières synthèses de protéines après la fécondation
- 12.5 Induction du mésoderme par l'endoderme chez les Amphibiens
- 12.6 Synthèses d'ARN nouveaux, expression du génome embryonnaire

La segmentation de l'œuf commence après la fécondation ou une activation. Il se divise rapidement, sans accroissement de volume et sans mouvements morphogénétiques importants (voir 2^e partie, Embryologie descriptive). Le cytoplasme ovulaire est abondant et hétérogène (voir chap. 3). Pendant la segmentation, il se répartit inégalement entre les blastomères dont les noyaux se trouvent ainsi au contact d'un cytoplasme de plus en plus diversifié et spécialisé. Ces localisations de plus en plus précises des composants de ce cytoplasme au sein de cellules distinctes ont un corollaire : des déterminations de territoires vont se manifester. Elles s'ajoutent aux déterminations déjà acquises (axe et plan de symétrie) et font que le devenir de certaines régions de la blastula est fixé de façon stricte. Ces déterminations sont plus ou moins précoces et étroites suivant les espèces. Il en résulte une diminution plus ou moins rapide de la capacité de régulation embryonnaire, c'est-à-dire de l'aptitude pour l'embryon à se différencier normalement, malgré des pertes en matériel cellulaire ou des apports accidentels ou expérimentaux de matériel excédentaire. La segmentation de l'œuf d'Insecte (ex. : drosophile) obéit à des règles très particulières (voir chap. 7) : les localisations cytoplasmiques y jouent un rôle (voir, par exemple les protéines Bicoïd et Nanos), mais les interactions nucléocytoplasmiques ont lieu bien avant qu'il y ait segmentation au sens propre, c'est-à-dire formation du blastoderme cellulaire.

Tandis que l'œuf se divise, les protéines synthétisées proviennent de la traduction dans un premier temps des ARN-m maternels accumulés pendant l'ovogénèse. Chez les Amphibiens, notre modèle de référence, la traduction des ARN-m ovocytaires est très largement prédominante jusqu'à la fin de la segmentation.

La compartimentation du cytoplasme ovocyttaire et l'élaboration de protéines nouvelles font que les cellules de la blastula constituent une population hétérogène. Des blastomères différents peuvent alors agir les uns sur les autres ; c'est ainsi que, vers la mi-blastula, des facteurs de transcription et des facteurs de croissance sécrétés par des blastomères végétatifs induisent l'aire mésodermique chez les Amphibiens.

Le rythme de la segmentation d'abord rapide et synchrone se ralentit et devient asynchrone. Cette transition survient plus ou moins tôt suivant les espèces. C'est la **transition blastuléenne** des Amphibiens. C'est alors qu'un programme nouveau est transcrit à partir du génome de l'embryon. Les ARN-m nouveaux seront traduits en protéines dès la gastrulation. Le relais entre les programmes maternel et embryonnaire est plus ou moins précoce suivant les espèces et leur mode de développement.

12.1 ACTIVITÉ MITOTIQUE PENDANT LA SEGMENTATION

Pendant la segmentation, les mitoses se succèdent rapidement. Le contrôle de la coordination des cycles mitotiques est assuré par le MPF (voir § 3.4.2a).

Les Amphibiens sont ici choisis comme exemple d'étude :

Les cycles cellulaires ne comptent ni phase G1 ni phase G2 (jusqu'au 12^e cycle chez le xénope). Les mitoses et les phases S alternent presque sans interruption. Des synthèses actives d'ADN ont lieu dans l'œuf d'Amphibien dès le début de la segmentation (observation également valable chez l'oursin) grâce à l'accumulation pendant l'ovogenèse des enzymes nécessaires à la duplication de l'ADN stockées dans le cytoplasme (ex. : l'ADN polymérase), et d'une importante réserve de nucléotides.



Le nombre des blastomères augmente de façon logarithmique, au rythme d'une division par 95 minutes chez *Triturus pyrrhogaster*. Le stade de la mi-morula à 240 blastomères est atteint 11 heures après la fécondation; celui de la mi-blastula avec 3 500 cellules à 19 heures ; la blastula âgée avec 8600 cellules à 21 heures. Le rythme ralentit progressivement ; le nombre des cellules n'a que doublé à 28 heures et n'augmente plus que de 3,8 fois pendant les 27 heures suivantes. Les données chiffrées n'ont qu'une valeur indicative. Elle varie suivant les espèces et les conditions d'environnement (température par exemple).

À la fin de la période de croissance logarithmique, qui se situe dans cet exemple au 12^e cycle (soit 2^{12} cellules), les divisions deviennent asynchrones, les cycles cellulaires s'allongent par apparition des phases G1 et G2. C'est surtout pendant G1 et, à un moindre degré, pendant la phase S qu'une cellule synthétise des ARN et des protéines spécifiques. Dans la blastula d'Amphibien, ce changement dans le rythme de la segmentation est appelé la **transition blastuléenne** (Signoret et Lefresne, 1971). Une activité transcriptionnelle s'installe et prépare la gastrulation et les organogénèses ultérieures. On peut prolonger le synchronisme en injectant des désoxyribonucléotides, la morphogénèse est alors supprimée et toutes les formes de synthèses d'ARN inhibées.

(Chez les Mammifères, il y a un asynchronisme plus précoce, qui est total après 4 ou 5 mitoses et on note une reprise rapide des synthèses d'ARN. La phase G1 est cependant absente au cours des premières divisions).



Un balancement entre ralentissement du rythme des mitoses et différenciation se retrouve au moment des organogénèses : neurulation, formation de l'œil etc. Il semble qu'il s'agisse là d'une règle assez générale. On ne peut cependant que faire des hypothèses sur le

mécanisme qui conditionne l'apparition de protéines spécifiques (phase de différenciation) et le ralentissement des mitoses (phase de prolifération). Le déclenchement de la différenciation dépendrait du nombre de mitoses qui ont eu lieu depuis le début de la segmentation, avec une programmation pour le début de la synthèse de chaque nouvelle protéine. Au-delà d'un nombre critique de mitoses, les répresseurs cytoplasmiques seraient suffisamment dilués pour que la dé-répression du génome soit possible. Il n'existe pas de preuve expérimentale pour cette hypothèse.

12.2 LOCALISATIONS EMBRYONNAIRES RÉSULTANT DE LA SEGMENTATION

Depuis les débuts de l'embryologie expérimentale, au XIX^e siècle, un rôle dans la détermination des blastomères a été attribué à des localisations de constituants cytoplasmiques observées dans l'œuf. En effet, des molécules séquestrées dans l'œuf déterminent dans les blastomères qui les hébergent des patrons de synthèse différentiels. Un premier exemple a été donné avec les protéines régulatrices de la polarité qui contrôlent, chez la drosophile, les gènes de segmentation dans les noyaux du blastoderme. Ces localisations ont des effets plus marqués dans le développement des œufs « en mosaïque ». Elles existent en réalité dans tous les types d'œufs, mais n'excluent pas cependant des possibilités de remaniements dans les œufs à régulation.

12.2.1 Caractère général des localisations cytoplasmiques dans l'œuf

a) Dynamique de distribution des déterminants cytoplasmiques

Les localisations résultent de l'organisation des éléments cytoplasmiques synthétisés pendant l'ovogenèse et de remaniements survenus à la maturation et à la fécondation.

- Une **polarité animale-végétative**, avec présence d'un gradient vitellin, a été décrite pendant l'ovogenèse, déterminant un axe animal-végétatif. Des molécules autres que celles formant les plaquettes vitellines apparaissent régionalisées suivant ce gradient. L'existence d'ARN-m caractéristiques d'une région donnée a été décrite (voir § 3.3.1e).
- À la **maturation**, lors de l'éclatement de la vésicule germinative, des localisations nouvelles sont observées. C'est le cas de protéines de la vésicule germinative d'Amphibiens, dont plusieurs ont été identifiées par immunolocalisation dans différentes régions du cytoplasme ovulaire et suivies pendant le début du développement (Dreyer et coll., 1983).
- À la **fécondation**, des remaniements cytoplasmiques modifient le patron de répartition hérité de l'ovocyte. Ce sont par exemple les remaniements aboutissant à la formation du croissant gris et à l'acquisition d'une polarité dorso-ventrale chez les Amphibiens (§ 4.5.1 et § 8.14).

Il est enfin des contenus cytoplasmiques ovocytaires qui déterminent très spécifiquement la destinée des cellules qui se les répartissent, c'est le cas du **plasme**

germinatif. On trouve ce dernier dans des œufs aussi variés que ceux des Amphibiens Anoures, des Nématodes, des Insectes. Les cellules qui les contiennent deviennent les cellules germinales primordiales (voir § 17.1.2).

b) Rôle du cytosquelette

Il est impliqué dans la mise en place et les déplacements des déterminants cytoplasmiques. Leurs localisations repérables par des pigments chez les ascidies (voir fig. 12.1) résistent à une centrifugation modérée. Le territoire du mésoderme de l'œuf de l'ascidie *Styela partita*, pigmenté en jaune, reste en place après que les 3/4 des protéines et la plus grande partie des ARN ont été éliminés par des détergents. La microscopie à balayage montre la présence d'une architecture cytosquelettique avec microtubules et microfilaments. De même, les pigments jaunes de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus* sont pris dans les mailles d'un cytosquelette cortical.

À la fécondation, la trame du cytosquelette se contracte. Chez les Oursins, la rétraction du cytosquelette aboutit à une répartition zonaire du pigment par suite d'un affaiblissement de la trame au niveau du pôle végétatif. Chez l'ascidie, cette rétraction fait que les pigments jaunes se répartissent suivant un secteur en forme de croissant. Nous avons vu § 8.1.4 que c'est dans le cytosquelette cortical de l'œuf d'Amphibien que la contraction des microfilaments d'actine provoque la formation d'une dissymétrie dorso-ventrale et d'un croissant gris ; les microfilaments interagissent avec les microtubules du spermaste pour redistribuer les éléments du cytoplasme végétatif.

c) Nature des déterminants cytoplasmiques

Il a été démontré que des ARN-m poly(A) sont retenus dans le cytosquelette de l'œuf d'ascidie. C'est le cas des ARN-m codant pour la phosphatase alcaline intestinale synthétisée dans l'ovocyte, qui se retrouvent dans les blastomères de l'endoderme, les seuls à synthétiser cette protéine. Chez la drosophile, la localisation des ARN-m *nanos* et *bicoid* est déterminée par leur liaison au cytosquelette (voir § 3.5.4d). Le déterminant germinal des cellules germinales primordiales est constitué de ribonucléoprotéines chez les Insectes comme chez les Amphibiens. D'autres exemples peuvent être cités : le gène *Brachyury* s'exprime chez les cellules précurseurs de la corde dès le stade 64 chez les ascidies, localisation analogue à ce qu'on trouve chez les Vertébrés.

12.2.2 Œufs à développement en mosaïque

a) Les œufs des Ascidies (Urocordés)¹

Ils subissent aussitôt après la rupture de la vésicule germinative et après la fécondation, des remaniements cytoplasmiques à la suite desquels on détecte des territoires correspondant à l'endoderme, l'ectoderme, le mésoderme, le tube nerveux et la corde grâce à des différences dans la pigmentation (fig. 12.1). Chez les Urocordés, la **segmentation est du type bilatéral**. Si on sépare les deux premiers blastomères issus

1. Proches des Vertébrés, les ascidies forment des têtards avec corde et tube neural dorsal. La corde disparaît chez l'adulte après une métamorphose.

Partie 3 • Mécanismes de la morphogénèse

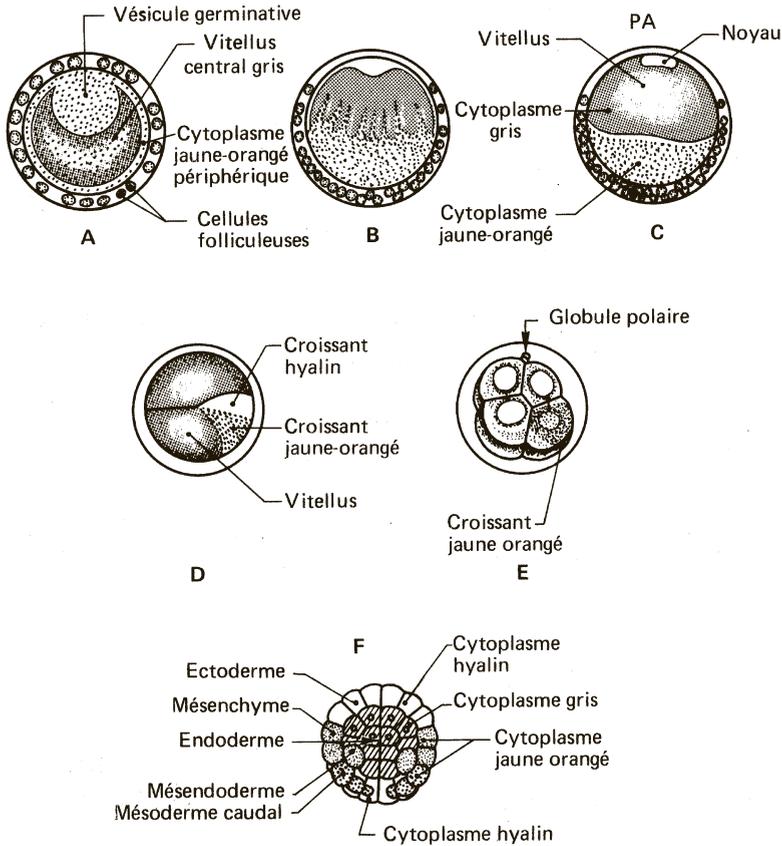


Fig. 12.1 - Exemple de localisations cytoplasmiques dans un œuf d'ascidie : *Styela partita*.

Mise en place du mésoderme. **A** : Œuf vierge. **B** : Migration de cytoplasme clair au pôle animal, après fécondation. **C** : Localisation du cytoplasme jaune au pôle végétatif. **D** : Symétrisation de l'œuf, croissant hyalin et croissant jaune. **E** : Stade 8 cellules vu depuis le côté gauche : le croissant jaune est inclus dans les blastomères postérieurs et dorsaux. **F** : Stade 64 cellules vu depuis le pôle végétatif. Le cytoplasme du croissant jaune se retrouve dans les blastomères qui donneront le mésoderme, le cytoplasme hyalin donne l'ectoderme, le cytoplasme gris l'endoderme, d'après Conklin, 1911.

d'un premier clivage suivant le plan de symétrie bilatérale, on obtient des larves petites dont les organes pairs manquent d'un côté. Si la séparation est frontale, les larves seront incomplètes. Dès le stade 2, il y a des ébauches capables de s'autodifférencier et incapables de compléter les parties manquantes, c'est-à-dire d'une **régulation des déficiences** (Conklin, 1911). Au stade 64 cellules, un lignage cellulaire est établi et chaque catégorie de cellules ne forme qu'une sorte de tissu. Cette ségrégation n'est pas encore établie dans l'ovocyte vierge qui n'est que faiblement polarisé. En effet, Dalcq (1932-1938) montre que la régulation est alors possible. Si on fractionne l'ovocyte en deux parties par ligature, le noyau ne se retrouve que dans une des deux

moitiés. Celles-ci peuvent être fécondées par deux spermatozoïdes différents. Elles se développent pour former deux têtards pratiquement normaux, l'un diploïde, issu de la moitié qui contenait le noyau de l'ovocyte, l'autre haploïde, issu de la moitié qui ne contenait que le noyau spermatique. Il existe donc des substances préformées dans l'œuf, les déterminants spécifiques de la différenciation épidermique, endodermique et mésodermique, mais les localisations et les polarités animale-végétative et dorso-ventrale ne sont établies qu'après la fécondation. Les premiers mouvements cytoplasmiques sont partiellement indépendants du point de pénétration du spermatozoïde et sont déterminés par les contractions des microfilaments corticaux. Ils sont ensuite guidés par les microtubules développés à partir du centriole proximal spermatique qui se trouve entraîné vers le pôle végétatif.

On a par exemple identifié les ARN-m de deux facteurs de transcription qui interviennent dans la différenciation des cellules musculaires. Ils sont localisés dans l'hémisphère végétatif de l'œuf vierge et migrent avec le cytoplasme du croissant jaune dès le premier cycle de division. On ne les retrouve finalement, aux stades 32-64 cellules, que dans les cellules à destinée musculaire. L'injection, dans l'œuf vierge de nucléotides antisens contre les ARN-m de l'un d'eux (*macho-1*) donne des larves dépourvues de cellules musculaires (Nishida et coll., 2001). *Macho-1* est donc nécessaire à la différenciation musculaire en activant plusieurs gènes du mésoderme, notamment *Tbx6* et *snail* (Yagi et coll., 2005) : la protéine *Tbx6* se lie à l'amplificateur d'un gène spécifique du muscle (*snail*) qui bloque, dans les cellules musculaires, la différenciation d'un tissu de type corde (Erives et coll., 2000). On a aussi identifié, comme chez l'oursin, les ARN-m de la β -caténine dans les cellules présomptives de l'endoderme ; l'inhibition ou la stimulation de sa synthèse provoque respectivement la réduction ou l'expansion de l'endoderme (Imai et coll., 2001).

b) Les œufs des Mollusques et des Annélides

Tous les embranchements dont les œufs sont à **segmentation spirale** (voir § 5.1.2) ont un développement « en mosaïque », c'est-à-dire que chaque cellule de la blastula a une filiation précise qu'on peut faire remonter jusqu'à la première division. Dès les premières divisions, des blastomères isolés ne forment que les éléments larvaires qu'ils auraient normalement donnés chez un embryon normal. Leur absence n'est pas compensée, il n'y a **pas de régulation des déficiences**. Un Mollusque Gastéropode, *Ilyanassa*, (fig. 12.2), fournit un exemple particulièrement démonstratif. Les quatre premiers blastomères sont nommés A, B, C, D. La première division sépare un blastomère AB et un blastomère CD. Le cytoplasme du pôle végétatif est entièrement annexé par CD et s'isole en une masse de cytoplasme, le **lobe polaire** formant une extrusion rattachée par un pédoncule. C'est le stade trèfle. À la seconde division, le contenu de ce lobe se retrouve uniquement au niveau du blastomère D, qui est entre autre à la base de toute la lignée du mésoderme cœlomique. Seul ce blastomère peut différencier une larve complète s'il est isolé. Le lobe polaire est très riche en ARN qui doivent porter une information distincte du reste du cytoplasme. En effet, les programmes de synthèse de protéines sont très différents au stade 2 blastomères, entre AB et CD.

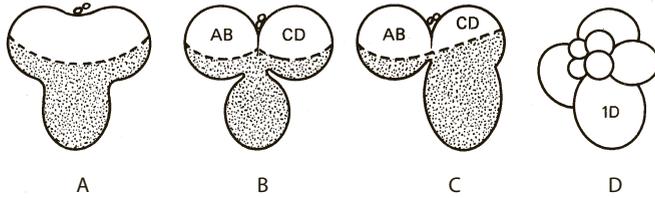


Figure 12.2 - Segmentation de l'œuf d'un Mollusque : *g. Ilyanassa*.

A, B, C : Première division; le cytoplasme végétatif se retrouve presque intégralement dans l'un des deux premiers blastomères (CD), à la suite d'une segmentation inégale (B, stade trèfle). D : Au stade 8 cellules, il est toujours localisé dans un blastomère 1D d'où s'isole plus tard le 4d, blastomère à partir duquel se forme le mésoderme.

L'ablation du lobe polaire seul qui ne contient que du cytoplasme et pas de noyau, entraîne la formation d'un embryon dépourvu de tout dérivé mésodermique cœlomique. Plus tard, le contenu du lobe se retrouve chez un des descendants de D, le micromère 4d. Dès lors, la présence du restant du macromère n'est plus fondamentale, son ablation n'altère plus la morphogenèse, la larve est simplement plus petite. La distribution des déterminants cytoplasmiques s'établit juste avant le début de la première division. Si, artificiellement, par pression, le contenu du lobe polaire peut être réparti entre les deux premiers blastomères, une séparation ultérieure de ces deux blastomères aboutira au développement de deux larves relativement normales. C'est la seule possibilité de régulation connue chez les œufs à segmentation spirale.

c) L'œuf de *Cænorhabditis elegans*

Ce petit Nématode se développe suivant un programme extrêmement précis. Son développement en 16 heures donne naissance à des individus mâles et hermaphrodites constitués respectivement de 1031 et de 959 cellules somatiques. Un lignage cellulaire a été parfaitement défini et l'embryon montre des localisations cytoplasmiques rigoureuses. Un **plasme germinale** contenant des **granules P** visibles dans l'œuf se localise successivement dans les blastomères d'où sortira la lignée germinale. La stabilité des déterminants cytoplasmiques est assurée par les microfilaments d'actine. En effet, si le cytosquelette d'actine est altéré sous l'action de la cytochalasine B, les redistributions successives des granules P n'ont pas lieu. L'inhibition de la formation des microtubules n'a, par contre, pas d'effet.

d) Les œufs d'Insectes

On a vu que le développement de ces œufs présente des caractères particuliers. On y connaît des localisations cytoplasmiques (déterminant germinale, ARN-m et protéines régulatrices de polarité). Dès la fécondation, les différentes populations successives de gènes régulateurs déterminent avec une grande précision le patron de développement. Celui-ci se met en place dans une **structure syncytiale**, multinucléée, mais sans membranes, ce qui pose en d'autres termes les problèmes de transmission d'information.



Dans les exemples choisis, il apparaît que les mitoses, dès le début de la segmentation de l'œuf, vont isoler en des cellules distinctes des constituants cytoplasmiques spécifiques qui contrôleront strictement la différenciation des cellules qui en dérivent. Ces constituants achèvent de se mettre en place après l'éclatement de la vésicule germinative et la fécondation. Ils sont souvent liés au cortex de l'ovocyte et sont maintenus dans des sites précis grâce aux microfilaments du cytosquelette. Pendant le développement, les interactions cellulaires y sont faibles, la détermination des ébauches est autonome.

12.2.3 Œufs à régulation

Il existe de nombreux œufs qui, bien que pourvus de localisations de constituants cytoplasmiques spécifiques, peuvent subir des ablations importantes de matériel cytoplasmique et se développer normalement. Leurs blastulas peuvent également être fragmentées ou recevoir des blastomères et former un embryon harmonieux. Cette plasticité, qui est la **capacité de régulation**, est mal comprise. On pense que les plans de segmentation sont organisés par rapport à l'organisation de l'œuf de telle façon que les composants du cytoplasme indispensables au développement se partagent entre les blastomères qui gardent ainsi les mêmes potentialités. Dans le cas contraire, les potentialités des blastomères diffèrent. Les œufs d'Oursins et les œufs de Vertébrés sont tous des œufs à régulation.

12.3 ŒUFS À RÉGULATION ET DÉTERMINATION DES TERRITOIRES

Dans des conditions normales, chaque organe se différencie à partir d'un territoire embryonnaire donné. Cependant, certains œufs, les œufs à régulation, peuvent compenser leurs pertes : un blastomère d'oursin prélevé au stade 4 est capable à lui seul de former un embryon entier. C'est ce qu'on appelle la **régulation des déficiences**. On montre aussi expérimentalement et on constate dans la nature, que deux embryons qui fusionnent précocement peuvent se développer en un seul individu harmonieux : c'est la **régulation des excédents**.

Les expériences de régulation permettent ainsi de préciser la détermination progressive des ébauches dans l'embryogenèse. En effet, quand une ébauche est déterminée, si on en fait l'ablation totale elle n'est plus remplacée par régulation ; si on fusionne deux ébauches elles ne forment plus un ensemble harmonieux. Par ailleurs, dans ce type d'œuf, l'embryon se forme à la suite d'une cascade d'interactions entre les ébauches correspondant à une suite d'inductions (voir chap. 15), qui ne se retrouvent pas dans les autres types d'œuf.

Les régulations sont étudiées chez les Oursins, les Amphibiens, Oiseaux et Mammifères.

12.3.1 Oursins (fig. 12.3)

Chez l'oursin *Paracentrotus lividus*, les quatre premiers blastomères peuvent être séparés et se développer normalement. Si l'œuf est sectionné horizontalement, seules les moitiés animales possédant une partie de la ceinture pigmentaire pour-

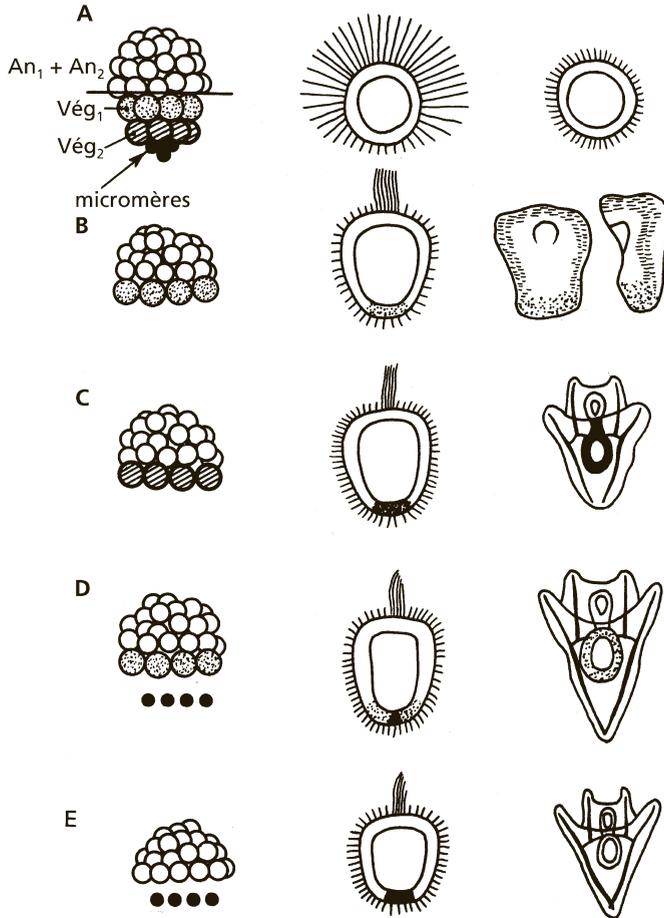


Figure 12.3 - Schémas de régulations des déficiences dans le développement de l'embryon d'oursin.

A : Les blastomères de l'hémisphère animal isolés n'évoluent pas. **B :** Pas de formation de larve pluteus en l'absence des blastomères végétatifs Vég2 et des micromères. **C :** Formation d'une larve pluteus aux bras réduits en l'absence des blastomères végétatifs Vég1 et de micromères. **D, E :** En présence de micromères, l'absence des blastomères Vég2 ou Vég1 plus Vég2 est compensée, il se forme des larves plutei normales. (d'après Hörstadius, 1939).

raient se développer jusqu'à la gastrula après activation. Dès le stade 16 cellules, les moitiés animales de la morula ne forment que des dérivés de type animal et les moitiés végétatives ne forment que des dérivés de type végétatif. Les localisations de déterminants cytoplasmiques n'excluent pas une possibilité de régulation puisque les seuls micromères de l'hémisphère végétatif, recombinaés aux mésomères de l'hémisphère animal permettent le développement d'un embryon harmonieux, malgré l'absence des macromères Vég1 et Vég2 (Hörstadius, 1939).

Les propriétés des micromères résultent d'une localisation d'informations antérieure à la fécondation. Le déterminant cytoplasmique qui contrôle, dans les condi-

tions normales, la différenciation des cellules de mésenchyme squelettique s'y trouve à la concentration maximale. Cette concentration va en diminuant dans les blastomères Vég2, puis Vég1. La β -caténine est un facteur de transcription qui se révèle essentiel dans la détermination des micromères (Ettensohn et Sweet, 2000). Ce facteur s'accumule d'abord dans les noyaux des micromères et de Vég2, cellules qui seront à l'origine du mésoderme et de l'endoderme, la concentration étant la plus élevée dans les micromères. L'emploi de chlorure de lithium provoque l'accumulation de β -caténine dans les noyaux d'autres cellules de l'embryon, et leur transformation en cellules végétatives ; à l'inverse, si l'accumulation nucléaire de β -caténine est inhibée, il ne se forme ni endoderme, ni mésoderme. La β -caténine est essentielle pour donner aux micromères leurs capacités inductrices en activant une cascade de gènes inducteurs ou répresseurs de transcription comme *Pmar1*.

D'autres gènes de développement s'exprimant suivant des modes de régulation complexes sont maintenant connus, proches de ceux des Vertébrés comme *BMP-4* qui a un effet animalisant, ou *Noggin* qui stimule des structures végétatives.

Le modèle œuf d'oursin concilie les localisations cytoplasmiques et une plasticité qui n'assigne pas irrémédiablement un devenir fixe à un type de blastomère dès les premières mitoses.

12.3.2 Amphibiens

a) Régulation des déficiences (fig. 12.4)

Les expériences portent surtout sur des tritons (Spemann, 1903). Les deux premiers blastomères sont séparés par une ligature au moment de la première division, suivant le plan de segmentation (il correspond dans 50 % des cas au futur plan de symétrie bilatérale de l'embryon). Si le premier clivage se fait suivant le plan de symétrie, la ligature passe par le centre du croissant gris et les 2 blastomères donneront 2 embryons complets. Si la segmentation est perpendiculaire au plan de symétrie, seule la partie dorsale contenant un croissant gris donnera un embryon complet et la partie ventrale formera une vésicule épidermique contenant des constituants issus du mésoderme ventral (éléments sanguins et mésenchymateux), des cellules du tube digestif, mais aucune formation dorsale, qu'elle soit mésodermique ou nerveuse. Si le 1^{er} plan de division se trouve dans une position intermédiaire entre ces deux extrêmes, les deux blastomères formeront un embryon à condition de contenir au moins 1/4 du croissant gris.

Si on isole les 4 blastomères au stade 4, les 2 blastomères dorsaux contenant du croissant gris évolueront en embryons, les blastomères ventraux formeront des vésicules indifférenciées.

Si au stade 8, on sépare 4 blastomères végétatifs, dont 2 contenant le croissant gris, et 4 blastomères animaux, seuls ceux de l'hémisphère végétatif contenant une portion de la région du croissant gris seront capables de régulation et évolueront en embryons.

Il existe des limites aux capacités de régulation dans toutes ces expériences, la présence d'une quantité minimale du matériel dorso-végétatif repéré par le croissant gris étant nécessaire pour que l'embryon soit organisé et que la régulation ait lieu. C'est dans



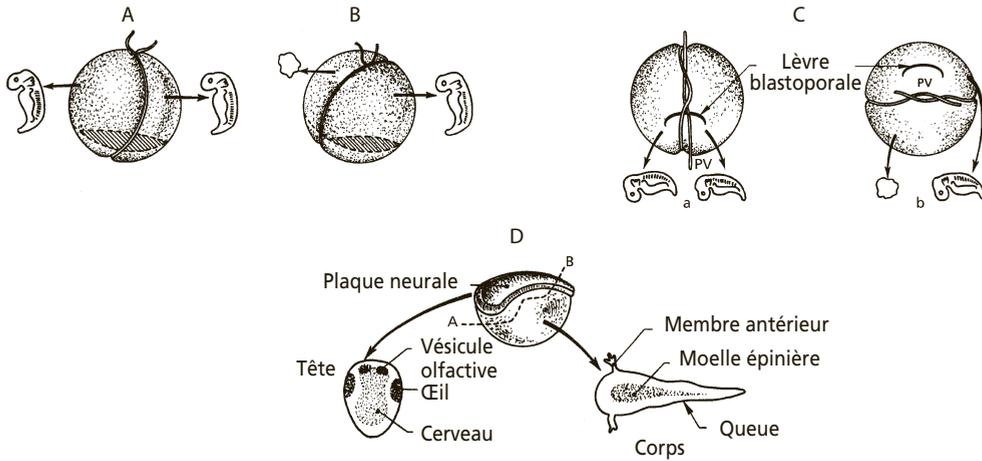


Figure 12.4 - Régulation des déficiences au cours de la segmentation et au début de la gastrulation du triton.

A : Ligature passant par le centre du croissant gris. **B :** 1^{re} division perpendiculaire au plan de symétrie et séparation des blastomères. **C :** Ligatures de jeunes gastrulas a) passage par le plan de symétrie ; b) vue polaire - ligature hors du plan de symétrie ne partageant pas le croissant gris. **D :** La régulation n'est plus possible chez une neurula. La partie antéro-supérieure différencie les formations céphaliques correspondant à ses territoires; de même la partie postérieure différencie un tronc et une queue. A-B : limite de la section en deux parties de la neurula, parties qui se différencient ensuite en culture.

cette région dorso-végétative que sont localisés les ARN-m maternels codant pour les principaux agents inducteurs des formations dorsales de l'embryon (voir § 12.5). Jusqu'à la fin de la gastrulation, le germe est doué d'une certaine totipotentialité dans la mesure où des ensembles cellulaires restreints sont susceptibles de constituer un organisme entier si une partie de la zone organisatrice dorso-végétative repérée par le croissant gris est contenue dans les éléments isolés. L'embryon se transforme ensuite en une mosaïque de territoires déterminés à l'intérieur desquels les potentialités de régulation se restreignent progressivement.

b) Limites dans le temps de la régulation des déficiences

On peut encore ligaturer une jeune gastrula suivant le plan de symétrie bilatérale et obtenir 2 embryons complets. Si la ligature est perpendiculaire au plan de symétrie bilatérale, seule la moitié contenant la lèvre dorsale du blastopore donne un embryon complet, l'autre ne se différencie pas (fig. 12.4C).

Si l'expérience est tentée chez une gastrula âgée (fente blastoporale) ou chez une neurula, une régulation des déficiences d'une telle ampleur n'est plus possible (fig. 12.4D). Holtfreter le montre sur une neurula qui est sectionnée en 2 et dont chaque moitié est mise en culture. La partie antérieure et dorsale poursuit la neurulation et peut donner un individu incomplet avec essentiellement un cerveau pourvu de vésicules olfactives, optiques et auditives. La partie postérieure donne une forme larvaire sans tête, avec un tronc contenant des formations mésodermiques et endo-

dermiques, une queue et parfois des membres. Chaque moitié poursuit sa propre différenciation mais aucune des 2 portions ne forme un embryon complet ; chacune, en l'absence de régulation des déficiences, manque de ce que l'autre possède.

c) Régulation des excédents

Mangold et Seidel (1927) fusionnent deux embryons de triton, au stade 2 blastomères, après les avoir dégangués, formant ainsi une chimère de 4 blastomères. L'orientation pôle animal-pôle végétatif est la même pour les deux embryons. Il se développe un embryon unique si les croissants gris des deux embryons fusionnés se retrouvent en continuité, ce qui dépend de l'orientation du premier plan de segmentation de chaque embryon. Si cette condition n'est pas respectée, chaque croissant gris ou portion de croissant gris programmera la formation d'une lèvre blastoporale, et l'on aboutira à deux ou trois embryons soudés par le ventre. L'embryon d'Amphibien peut donc assimiler le matériel en excès et former un embryon cohérent. C'est un autre aspect de la propriété décrite précédemment. Ici encore **apparaît l'importance du matériel dorso-végétatif de la région du croissant gris pour l'organisation de l'embryon**. On constate que, pour chaque embryon, la détermination d'une symétrie dorso-ventrale n'est plus susceptible de régulation.

d) Étude de la détermination des territoires et de la disparition de la capacité de régulation

La carte des territoires présomptifs, chez les Amphibiens, représente le devenir de chaque partie de l'œuf dans les conditions normales. Cependant, comme le montrent les expériences de régulation, avant la gastrulation, ces territoires ne sont pas tous déterminés c'est-à-dire qu'ils n'ont pas tous une destinée déjà fixée. Les travaux de Holtfreter (1931-1938) ont permis de connaître l'état de détermination des ébauches et de montrer l'apparition de leurs capacités d'autodifférenciation. Des fragments d'ectoderme, endoderme et mésoderme sont explantés et cultivés dans une solution physiologique salée ; leur état de différenciation après quelques jours indiquera leur état de détermination et leurs capacités de régulation au moment de l'explantation.

Ces expériences ont été reprises par Nieuwkoop (1969) sur le xénope.

- La calotte animale qui correspond à l'**ectoderme** au stade de la blastula âgée, donne des cellules épidermiques.
- Le territoire du **mésoderme** prélevé dans la zone marginale au début de la gastrulation manifeste de grandes potentialités morphogénétiques : la zone dorsale donne corde, somites et lames latérales, elle donne aussi de l'épiderme mais pas d'endoderme. Les explants provenant de diverses parties du mésoderme montrent qu'il y a décroissance progressive de la capacité d'autodifférenciation des structures dorsales vers la face ventrale. **Il y a une régionalisation à l'intérieur du mésoderme**. Une partie du mésoderme qui se trouve au plancher du blastocèle (mésoderme ventral) forme des ébauches de gonades, appareil excréteur, cœur et sang. **Le mésoderme est donc déterminé et, en outre, largement capable de régulation dès le début de la gastrulation** ; cette détermination s'est produite chez la blastula (voir § 12.5 et fig. 12.7).

- Les explants d'**endoderme** donnent en culture les mêmes formations que dans l'embryon normal, c'est-à-dire des tissus du tube digestif et de ses annexes. **Cette région est donc déterminée d'une façon rigoureuse, et s'autodifférencie suivant cette détermination, mais est incapable de régulation à la fin de la segmentation.**

On peut rapprocher ces résultats des expériences d'isolement de blastomères ou de moitiés de gastrula. En effet, ces expériences montrent aussi que les blastomères ou fragments d'embryons qui sont capables de régulation et de différenciation sont ceux qui contiennent de l'endoderme et une quantité suffisante de mésoderme dorsal ; par contre, les blastomères de l'hémisphère animal ne contenant que de l'ectoderme sont incapables de régulation et de différenciation.

Pendant la gastrulation, la détermination de l'ectoderme et la disparition du pouvoir de régulation dans le mésoderme feront progressivement de l'embryon une mosaïque de territoires déterminés capables de s'autodifférencier.

12.3.3 Oiseaux

Leurs embryons possèdent une large faculté de régulation. À la ponte, l'embryon est un blastoderme. Son plan de symétrie bilatérale est fixé. Son axe céphalo-caudal est perpendiculaire au grand axe de la coquille. Il n'y a cependant pas encore de territoire déterminé (Wolff et Lutz, 1947), et un embryon peut être obtenu à partir de n'importe quelle partie du germe après que le blastodisque a été fissuré avec une aiguille de verre. L'axe céphalo-caudal est déterminé très tôt, lorsque le centre organisateur constitué par la **zone marginale postérieure** est en place et que l'hypoblaste a immigré sous le blastodisque (voir § 9.3.1). Chez l'embryon de poulet, ce stade du développement n'est pas encore atteint au moment de la ponte en période hivernale, car le développement est ralenti. On obtient alors, après fissuration, des embryons provenant de la partie antérieure du disque où l'hypoblaste n'est pas encore installé, et qui peuvent être orientés dans un sens quelconque.

La zone marginale postérieure stabilise la polarité céphalo-caudale de l'embryon (Khaner, 1995) ; elle induit la migration des cellules de l'hypoblaste et inhibe la formation de toute autre zone de migration cellulaire autour du disque embryonnaire ; l'hypoblaste n'a pour rôle que de guider les mouvements de la ligne primitive.

12.3.4 Mammifères

La première détermination dans l'œuf de Mammifère survient pendant la segmentation avec la différenciation du trophoctoderme qui accapare les 2/3 des cellules du blastocyste. Le bouton embryonnaire isolé est incapable de s'implanter, et la vésicule trophoctodermique seule ne se développe pas. Cependant, dans le blastocyste, de larges possibilités de régulation subsistent. En effet, les cellules de la masse cellulaire interne (voir § 10.2.1), à l'origine de l'épiblaste et de l'hypoblaste, conservent durant les premiers jours du développement une grande plasticité leur conférant des possibilités de modifications de destinée en fonction de leur environnement. Leur spécification ne s'établira que progressivement au cours de la formation du blastocyste. Ces cellules, en raison de leur capacité à s'engager *in vitro* dans de

multiples voies de différenciation selon les conditions de culture, attestent de leur pluripotentialité. Elles constituent les **cellules souches embryonnaires** ou **cellules ES** (pour « **Embryonic Stem cells** ») (voir § 16.5). Aucun déterminant cytoplasmique n'a encore été mis en évidence. On a cependant montré que la protéine STAT3 (pour « Signal Transducer and Activator of Transcription ») ainsi que la leptine sont localisées dans le cortex des ovocytes de la souris et de la femme et fonctionnent potentiellement pour déterminer l'asymétrie au début de la segmentation (Antczak et Van Blerkom, 1997). Par ailleurs, on a mis en évidence une distribution différentielle de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription Oct-4 au cours des phases précoces de la formation du blastocyste (voir § 16.5).

a) Régulation expérimentale des déficiences

Depuis longtemps, des auteurs ont obtenu soit chez le lapin (Seidel, 1960) soit chez la souris (Tarkowski, 1959; Mulnard, 1965), des développements d'embryons complets à partir d'un blastomère isolé au stade 2. Williadson (1981) a dissocié des embryons de brebis en blastomères isolés au stade 4 et au stade 8 cellules. Les 4 premiers blastomères réimplantés chez 4 mères porteuses différentes ont donné naissance à 4 agneaux à terme. Des embryons se développent aussi à partir de blastomères issus d'un stade 8 cellules, mais avortent plus ou moins vite, après avoir cependant montré des capacités de régulation totale. Ces procédés de dissociation d'embryons et de réimplantation de blastomères sont employés en médecine vétérinaire.

b) Régulation naturelle des déficiences

Elle est fréquente dans la nature. C'est le cas de la **polyembryonie** chez certaines espèces (chez les tatous du genre *Dasybus* se développent, suivant les espèces, entre 4 et 7 individus à partir d'un œuf), ou de la **gémellité**. Les **jumeaux vrais** ou **univitellins** proviennent du développement d'un seul œuf. Le dédoublement peut s'effectuer dès la première mitose, chaque embryon possédant ses annexes ; il peut aussi être tardif au stade blastocyste; les jumeaux sont alors en miroir, ce qui prouve que le dédoublement s'est produit après fixation du plan de symétrie. Ils ne possèdent parfois qu'un seul amnios, ce qui prouve que le dédoublement s'est produit après formation de cette cavité. La faculté de régulation paraît étendue dans l'espèce humaine et se prolonge jusqu'à la gastrulation. Lorsque la séparation est incomplète, il se forme des monstres doubles soudés par une partie du corps (frères et sœurs siamois).

c) Régulation des excédents (fig. 12.5)

Expérimentalement, Tarkowski (1961) et Mintz (1961) l'ont mise en évidence les premiers en fusionnant après élimination des zones pellucides, deux embryons de souris fécondés, prélevés avant leur implantation et cultivés *in vitro* ; les embryons sont aux stades 8 et même 16 et 32 blastomères. Les blastomères reconstituent un seul embryon qui est réimplanté à l'état de blastocyste dans un utérus de souris en pseudo-gestation. Ils obtiennent des souriceaux chimères parfaitement viables, et féconds lorsqu'ils ne sont pas intersexués. La réussite de la fusion est montrée par

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

l'emploi d'œufs porteurs de caractères génétiques spécifiques, comme la couleur du pelage : à partir de souris noires et blanches, on obtient des chimères portant des taches ou des bandes noires et blanches. La fusion de trois blastocystes porteurs chacun d'un marqueur génétique lié au pelage a même été obtenue avec succès, formant une souris « **hexaparentale** » (Market et Petters, 1978). Cette capacité étendue de régulation a permis de mettre au point des techniques expérimentales.



La technique de régulation des excédents chez les Mammifères a évolué en une technique dans laquelle on insère une ou plusieurs cellule(s) munie(s) d'un marqueur génétique dans un blastocyste. On peut alors étudier la lignée cellulaire qui s'est différenciée à partir d'une cellule, ou l'origine des tissus différenciés dans une chimère dans laquelle on a pu, à volonté, faire varier les proportions entre le nombre de cellules issues de la prolifération des blastocystes et des cellules injectées. Celles-ci peuvent être des cellules transformées, des cellules germinales, des cellules d'un sexe génétique différent de celui du receveur, etc. (voir § 17.3.3b).

Si des cellules issues d'une cellule transgénique insérée dans un blastocyste se retrouvent dans les cellules souches de la lignée germinale, on obtient des gamètes porteurs du gène muté et l'individu issu du blastocyste sera alors capable de transmettre le génome transgénique par croisement.

Dans les conditions naturelles, et même dans l'espèce humaine, on pense que deux œufs fécondés chacun par un spermatozoïde peuvent s'accoler au stade blastula et donner un individu chimère. Certains cas pathologiques s'expliqueraient tels la coexistence de groupes sanguins différents d'un système donné chez le même individu ou des cas de mosaïque sexuelle résultant de la fusion d'embryons XX et XY accompagnés d'anomalies diverses.

Ces fusions sont tolérées car, chez l'embryon, il n'y a pas encore de réaction immunologique, donc pas de rejet des tissus de l'autre embryon. Elles démontrent de toute façon que l'aptitude à la régulation est très étendue chez les Mammifères.

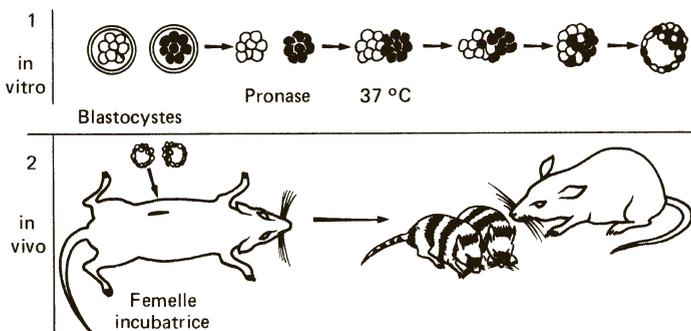


Figure 12.5 - Régulation des excédents chez la souris.

Des morula provenant de souris de races différentes sont dégagées des zones pellucides et dissociées *in vitro* par de la pronase ; les cellules réagrégées forment un blastocyste qui est implanté dans l'utérus d'une souris qu'on a au préalable accouplée à un mâle stérile pour la rendre apte à la gestation. Les souriceaux sont normaux et présentent une mosaïque des caractères de leurs 4 parents (d'après Mintz, 1967).

En résumé

La faculté de régulation des excédents ou des déficiences peut être observée chez un certain nombre d'organismes. Elle s'exprimera en respectant les polarités mises en place précocement. L'axe animal-végétatif chez les Amphibiens, ou antéro-postérieur chez les Insectes, est toujours fixé avant la fécondation. La polarité dorso-ventrale est fixée très précocement ; elle commence à être déterminée pendant l'ovogenèse chez les Insectes, à la fécondation chez les Ascidies et les Amphibiens. Certains embryons perdent très tôt la capacité de régulation ; c'est le cas des œufs « en mosaïque » comme l'œuf d'ascidie ou les œufs à segmentation spirale qui la perdent dès la fécondation. D'autres la conservent jusqu'à la gastrulation, c'est le cas des œufs à régulation des Vertébrés. On pense qu'une localisation précoce et précise d'éléments cytoplasmiques responsables de la détermination d'ébauches serait un mécanisme adaptatif très ancien. Il permettrait aux œufs qui se développent avec peu de réserves dans le milieu extérieur de devenir rapidement une larve complexe capable de se nourrir elle-même. De telles contraintes évolutives se seraient manifestées de façon moins impérative pour les espèces à développement protégé.

Quand le territoire d'une ébauche n'est plus capable de régulation, l'ébauche est déterminée. La détermination n'est pas simultanée pour toutes les ébauches d'organes ou tous les feuilletts : chez les Amphibiens, l'endoderme est déterminé, alors que le mésoderme est encore capable de régulation. On verra en outre qu'à l'intérieur d'une ébauche d'organe déterminée globalement, le jeu des régulations et déterminations se renouvelle à une autre échelle, entre les différentes parties de l'organe qui ne sont pas encore déterminées (voir chap. 15).

12.4 PREMIÈRES SYNTHÈSES DE PROTÉINES APRÈS LA FÉCONDATION

Dès le début du développement embryonnaire, les synthèses de protéines sont actives. Ces synthèses résultent de la traduction d'informations maternelles.

Dans un premier temps, ce sont les ARN-m accumulés pendant l'ovogenèse qui sont traduits. Une transcription immédiate du génome embryonnaire n'est pas nécessaire pour assurer le début de la segmentation. Les Mammifères font exception : leur rythme de segmentation au début du développement est très lent et par ailleurs les possibilités pour l'embryon de trouver des éléments nutritifs hors de l'œuf sont immédiates. Il en résulte que le rôle des ARN-m maternels est très réduit dans ce taxon.

La nature des protéines synthétisées évolue pendant la segmentation car il existe des régulations post-transcriptionnelles préalables à la traduction des ARN-m maternels.

Dans un second temps, au plus tard à la fin de la segmentation, apparaissent des protéines nouvelles qui résultent de la traduction des ARN-m propres à l'embryon.

Cette transcription débute dès les premières divisions de l'œuf chez les Mammifères. Chez les autres groupes zoologiques étudiés, elle commence plus ou moins tard au cours de la segmentation.

12.4.1 Accroissement du taux de synthèses des protéines au début du développement

L'événement qui stimule les synthèses des protéines qui avaient cessé dans l'œuf mûr n'est pas le même dans toutes les espèces.

La proportion de ribosomes qui se trouvent inclus dans les polyribosomes constitue un bon indice de l'évolution de ces synthèses. En effet, à chaque ribosome présent sur un polyribosome correspond une chaîne peptidique en cours d'élongation.



– **Chez les Oursins et certains Mollusques**, c'est la fécondation qui réactive les synthèses de protéines. Dans l'œuf vierge, on trouve moins de 1 % de ribosomes dans les polyribosomes. Cette proportion augmente et devient 100 fois plus élevée quelques heures après la fécondation, dans une morula de 4 à 8 cellules.

– **Chez les Amphibiens**, la formation de polyribosomes a déjà commencé à croître au cours de la maturation, passant de 2 % dans l'ovocyte mûr à 4 % après la maturation. Après la fécondation, 6 % des ribosomes appartiennent à des polyribosomes ; suit une augmentation jusqu'à 15 % à la mi-blastula. Ce taux se stabilise jusqu'à la gastrula. Il apparaît ainsi que la proportion de ribosomes maternels encore disponibles pour la traduction ultérieure d'autres ARN-m reste importante et n'est totalement utilisée qu'au stade du bourgeon caudal.

– **Chez les Mammifères**, il n'y a pas d'augmentation réelle du taux des synthèses de protéines à la fécondation. Les synthèses ont été stimulées à la maturation, elles restent peu importantes pendant les premières divisions. Le niveau de synthèses qui s'établit dans le blastocyste n'augmente pas sensiblement jusqu'à la gastrulation.

12.4.2 Premières synthèses de protéines, traduction des ARN-m maternels : cas des Oursins et des Amphibiens

L'emploi de sondes d'ADN (voir encart 12.1) permet d'analyser qualitativement les populations d'ARN.

Il existe dans l'œuf des Oursins et des Amphibiens une population d'ARN-m poly(A) de grande taille. Une part parfois importante de cette population moléculaire (jusqu'à 70 % dans certaines espèces) ne forme pas de polyribosomes et on ignore s'ils sont traduits plus tard. Ils ont de toute façon disparu chez le têtard. Le restant des ARN-m poly(A) maternels correspond à un véritable message. Les hypothèses concernant leur mode d'activation ont été envisagées avec la fécondation (voir § 4.5.2e).

a) Oursins

Il existe une autonomie des synthèses protéiques par rapport aux synthèses d'ARN nouveaux jusqu'au début de la gastrulation. Ce n'est pas avant ce stade du développement (c'est-à-dire le début des mouvements morphogénétiques équivalant au début de la gastrulation chez les Amphibiens) que des protéines d'origine paternelle sont mises

ENCART 12.1 Établissement de sondes d'ADN

À partir d'une population d'ARN-m poly(A) maternels purifiés provenant de l'ovocyte de xénope, plusieurs laboratoires ont constitué des « librairies ». Celles-ci correspondent à un ensemble de sondes d'ADNc qui, après leur marquage par un fluorochrome, peuvent ensuite reconnaître par hybridation les ARN-m dont ils sont la copie, dans les populations d'ARN extraits à divers stades de développement. Les hybrides ADN-ARN sont isolés et un dosage par des méthodes immunochimiques permet d'évaluer la quantité de molécules d'ARN-m hybridées. Il faut préciser que cette technique expérimentale ne permet que d'obtenir des sondes au hasard ; celles-ci correspondent à des ARN dont le message n'est pas forcément connu. L'emploi de ces sondes permet cependant de faire des comparaisons quantitatives et qualitatives très fines entre stades différents, puisqu'elles permettent à chaque stade de repérer la présence éventuelle des mêmes ARN en évaluant leur quantité ou de constater leur absence.

en évidence par immunochimie. Si, d'autre part, les embryons sont issus de parents appartenant à des genres différents (*Sphærechinus x Paracentrotus*), le développement est impossible, mais la mortalité ne commence à se manifester que vers ce stade ; la segmentation est par contre normale. Ni l'énucléation de l'œuf activé parthénogénétiquement ni l'emploi d'actinomycine D¹ n'empêchent une certaine activité de segmentation (Harvey 1963; Gross et Cousineau 1963).



La plupart des protéines traduites au début de la segmentation l'étaient aussi dans l'œuf vierge. C'est plus la quantité de protéines synthétisées qui change que leur nature. Les histones emmagasinées dans l'œuf ne sont incorporées que dans les noyaux des premières divisions. De nouvelles molécules d'histones sont synthétisées à partir du stade 16 cellules, traduisant des ARN-m maternels auparavant séquestrés dans le noyau de l'œuf. Le programme de traduction des ARN-m est régulé dans le temps. C'est ainsi que l'enzyme d'éclosion qui digère la membrane de fécondation et permet la libération de la blastula ciliée, n'est synthétisée que depuis la mi-blastula, alors qu'il est démontré, par étude des hybrides interspécifiques, que cette protéine est d'origine purement maternelle.

b) Amphibiens

Il y a, dans l'ovocyte de xénope, 21 ng d'ARN-m traductibles qui sont stables. À la mi-blastula, ils ont progressivement été tous incorporés dans les polyribosomes.

Les ARN-m codant pour les histones sont traduits dès la maturation. Le rythme de traduction a doublé à la blastula (5 500 µg/h). Ces histones, suffisantes dans le début de la segmentation, seront complétées à la blastula par les molécules stockées pendant l'ovogenèse pour faire face aux besoins qui s'accroissent avec le nombre des noyaux en division.

Les ARN-m de l'ovocyte suffisent au développement jusqu'à la fin de la segmentation. Les premières tentatives pour supprimer toute transcription d'ARN nouveaux

1. L'actinomycine D se fixe au niveau des bases guanine de l'ADN et empêche la poursuite de la transcription.

ont consisté à énucléer des œufs de *Rana pipiens* (Briggs et King, 1955). L'œuf anucléé se segmente et forme une « blastula » partielle. La synthèse des membranes plasmiques avec ses composants glycoprotéiques et lipoprotéiques, la formation de fuseaux mitotiques et d'asters avec les protéines du cytosquelette dépendent donc d'informations présentes dans le cytoplasme avant l'énucléation. Il n'y a pas de différences qualitatives dans la synthèse des protéines entre les œufs normaux ou anucléés, jusqu'à la mi-blastula. Les synthèses d'histones sont notamment activées.

L'emploi d'inhibiteurs de synthèses d'ARN, comme l'actinomycine D ou l' α -amanitine¹ confirme ces résultats. Ils sont moins traumatisants qu'une énucléation et n'empêchent pas une segmentation normale jusqu'à la gastrula exclue, chez le pleurodèle et le xénope. La segmentation est donc possible jusqu'à la blastula âgée en l'absence de toute synthèse nouvelle d'ARN.

Parmi les ARN-m de l'ovocyte se trouvent les messagers des facteurs de croissance, FGF et TGF- β , et ceux des protéines régulatrices de transcriptions qui interviennent dès la mi-blastula dans l'induction du mésoderme (voir § 12.5.8 et 12.7). Ils sont traduits dès la fécondation. Des ARN-m transcrits par le génome embryonnaire les remplaceront progressivement à partir de la **transition blastulénne**.

Il en résulte que les caractères maternels sont les seuls qu'on puisse déceler au cours de la segmentation. Les premières protéines codées par les gènes d'origine paternelle ne commencent à apparaître qu'à partir de la blastula âgée ; leur détection, très faible, s'intensifie aux stades suivants.

12.4.3 Traduction des ARN-m maternels pendant la segmentation chez les embryons de Mammifères

Les Mammifères diffèrent des exemples précédents par la lenteur des phases initiales du développement et la faible quantité d'ARN maternels traduits. Il existe des différences notables d'une espèce à l'autre.

a) Les ARN-m maternels ont la même stabilité en durée absolue que chez les Oursins et les Amphibiens (environ 2 jours)

La différence fondamentale observée entre le développement précoce des Mammifères d'une part et celui des Amphibiens et Oursins d'autre part, est que 24 heures après la fécondation, on n'est qu'au début de la segmentation chez les premiers tandis que la segmentation ou la gastrulation est achevée chez les seconds.

Les ARN-m poly(A) forment environ 8 % des ARN totaux chez l'embryon de souris à la fécondation. Leur traduction paraît lente, si on la compare à celle des Oursins dont l'ovocyte est de même taille. Une partie des ARN-m serait sous-employée ; la densité en ribosomes par polyribosome qui indique le rythme de traduction en protéines, serait quatre fois plus faible que dans un polyribosome pleinement actif, alors que la quantité de ribosomes n'est pas limitative et qu'une partie reste inemployée.

1. L' α -amanitine est un inhibiteur de l'ARN polymérase et empêche l'élongation des chaînes d'ARN-m.

Les ARN maternels sont, d'autre part, fortement dégradés dès la fécondation et durant la segmentation : 40 % des ARN poly(A) et des ribosomes disparaissent (Bachvarova et de Léon, 1980). Le milieu cytoplasmique de l'œuf fécondé semble d'ailleurs favorable aux dégradations, puisque des ARN-m exogènes qu'on injecte sont dégradés 100 fois plus vite dans des œufs de souris que dans les ovocytes en croissance (Ebert et coll., 1983).

Cette dégradation des ARN maternels est accompagnée d'une reprise rapide des synthèses d'ARN par l'embryon; le milieu cytoplasmique de l'œuf devient favorable à la transcription juste avant la première division. Chez la souris, il n'y a pas, en réalité, de période quiescente après la fécondation, bien que le taux des ARN nouveaux reste relativement faible (1,5 % de l'ARN maternel total). Chez d'autres espèces, la reprise des transcriptions est plus tardive, au stade 4 à 8 cellules chez l'homme, 8 à 16 chez la vache ou le mouton.

b) La synthèse de protéines au début de la segmentation est dépendante des ARN-m maternels

La synthèse d'ARN zygotiques n'est pas nécessaire au début de la segmentation. En effet, l'emploi d' α -amanitine bloque la transcription à 95,5 %, mais n'empêche pas le début de la segmentation ni chez la souris (Golbus, 1973) ni chez le lapin (Manes, 1973). Cette indépendance est illustrée chez la souris : ce n'est qu'au 5^e jour, blastocyste tardif, que des formes paternelles d'une enzyme, la glucose 6-P-isomérase, peuvent être mises en évidence. L'interprétation correcte de telles données est compliquée par le fait que les gènes ne sont pas activés au même moment, suivant qu'ils sont d'origine paternelle ou maternelle.

La majorité des polypeptides présents dans l'ovocyte mûr continue à être synthétisée dans l'œuf fécondé. Cependant, à chaque stade du développement, des changements dans le programme des synthèses de protéines ont été identifiés. Ces modifications sont post-transcriptionnelles et résultent en grande partie de modifications dans le patron de glycosylation ou de phosphorylation des protéines.

12.4.4 Régulation de la traduction des ARN-m maternels pendant la segmentation chez les Amphibiens

On pense que 10 % des ARN-m poly(A) transcrits sont la traduction d'ADN mitochondrial. C'est uniquement l'évolution des ARN-m nucléaires que nous suivons ici.

La plupart de ces ARN-m maternels étudiés reste stable jusqu'au début de la gastrulation. Plus de 80 % sont inclus dans des polyribosomes 2 à 3 heures après la fécondation, vers le stade 16 cellules. La traduction des ARN-m restants est plus tardive. On note aussi que certains transcrits typiquement maternels disparaissent tôt après la fécondation (Dworkin et coll., 1980, 1985).

Il y a eu, à la fin de l'ovogenèse, une sélection des ARN-m qui doivent être traduits au début du développement et une mise en réserve d'autres ARN.

On sait en effet que ce n'est pas le même ensemble qui est traduit constamment pendant le début du développement. Un des mécanismes pouvant rendre compte des

changements dans la composition de cet ensemble est la dégradation sélective des ARN-m maternels dont la longévité serait en relation avec la vitesse de raccourcissement du polynucléotide poly(A) lié en 3' à la molécule d'ARN-m. (Voir description du mécanisme § 4.5.2e.)

En résumé

La traduction d'ARN-m maternels au début du développement s'observe dans tous les groupes zoologiques étudiés.

Au début de la segmentation, tous les œufs traduisent des ARN-m maternels. Par exemple, ceux qui codent pour les histones ou les protéines du cytosquelette se retrouvent dans tous les groupes étudiés.

Ces ARN-m sont pour leur plus grande part intégrés dans des polyribosomes qui incluent une fraction significative de ribosomes. L'activation du système peut se situer à la maturation ou à la fécondation.

La traduction des transcrits est régulée au niveau du cytoplasme avec l'apparition séquentielle de protéines spécifiques au cours de la segmentation. Une excellente illustration est fournie par l'observation de l'évolution des synthèses de protéines dans le lobe polaire isolé du Mollusque *Ilyanassa* (§ 12.2.2b). On y montre que les changements dans le patron des synthèses sont très semblables à ceux qu'on trouve dans l'embryon entier au cours du premier jour de développement, c'est-à-dire jusqu'au stade de jeune gastrula. Le mécanisme minuté qui aboutit à une mobilisation retardée d'ARN-m préexistants, intervient de la même façon dans les lobes isolés ou dans l'œuf entier.

12.5 INDUCTION DU MÉSODERME PAR L'ENDODERME CHEZ LES AMPHIBIENS

On a pu déterminer dans l'œuf d'Amphibien une aire animale et une aire végétative qui diffèrent par des caractéristiques membranaires et par la composition de leur cytoplasme. Une quantité croissante d'ARN-m a été localisée avec précision, comme les ARN codant pour les facteurs de croissance inducteurs, TGF- β , FGF, etc. La segmentation cloisonne le cytoplasme hétérogène, et les blastomères qualitativement différents peuvent alors montrer une spécialisation dans leur destinée qui sera plus ou moins précoce et plus ou moins stricte. On a montré, sur les œufs de plusieurs espèces d'Amphibiens (xénope, grenouille, axolotl), que ces blastomères agissent très tôt les uns sur les autres dans une série de processus d'induction. Il s'agit de l'émission par certains d'entre eux de substances (des inducteurs) qui, au contact de récepteurs convenables de blastomères cibles (les cellules compétentes) orientent le devenir de ces derniers (voir chap. 15). Ces inductions aboutissent à la détermination d'une **zone marginale** à destinée mésodermique entre l'aire animale et l'aire végétative de l'œuf. Dans un premier temps, seuls les produits de l'activité du génome maternel sont en jeu, puisque les transcriptions d'ARN-m nouveaux ne commencent qu'à la mi-blastula.

12.5.1 Une aire mésodermique est progressivement déterminée dans la zone marginale

Le blastocèle se forme dès les premières divisions, ce qui a pour effet de séparer les deux moitiés animale et végétative, sauf dans la **zone marginale** où elles restent en contact direct. C'est donc au sein de cette zone qu'ont lieu les inductions qui aboutissent à la détermination du mésoderme. Les cellules dorso-végétatives induisent du mésoderme dorsal, les cellules ventro-végétatives, du mésoderme ventral.

Le mésoderme axial, c'est-à-dire le territoire de la corde et du mésoderme céphalique, est déterminé au stade de la blastula précoce (Nakamura et coll., 1970-1978). En effet, les auteurs explantent en culture *in vitro* des cellules de blastula provenant de la zone présomptive de la lèvre dorsale du blastopore d'embryons de xénope : si l'explant est prélevé à partir d'embryons de 32 à 128 cellules, on obtient seulement en culture prolongée des structures ciliées atypiques ; si l'explant est prélevé à partir d'embryons de 256 cellules et plus, un mésoderme de type axial abondant se différencie.

12.5.2 La détermination du mésoderme dorsal dans la jeune blastula résulte d'inductions provenant de l'endoderme dorso-végétatif (Gimlich et Gerhart, 1984) (fig. 12.6)

On peut bloquer la formation des structures axiales mésodermiques en irradiant le pôle végétatif de l'œuf aux rayons ultra-violet, avant la première division de segmentation. Le cytosquelette est alors altéré, la rotation de symétrisation est empêchée. La segmentation a lieu mais la gastrula est atypique.

Dans ces conditions on remplace, au stade 32 cellules de l'embryon irradié, 2 ou 3 des 8 blastomères végétatifs par des cellules de donneur non irradié de même stade. Les cellules sont repérées d'après un plan de symétrie passant par PA-PV et le point de pénétration du spermatozoïde, le secteur dorsal étant à l'opposé de ce dernier (voir § 8.1.4).

Quand les cellules greffées proviennent de la région dorso-végétative de l'embryon sain, le taux de déficience chez l'embryon greffé est réduit : dans 85 % des cas, des structures axiale et para-axiales mésodermiques (corde, somites) se différencient (contre 20 % seulement chez les animaux non greffés). La gastrulation et la formation du blastopore sont normales. Par contre, quand le greffon provient des régions ventro-végétatives ou ventro-latérales d'un embryon sain, le taux des déficiences chez les animaux opérés reste aussi élevé que chez les non greffés.

Cette « guérison » n'est pas due à des migrations de cellules provenant des greffons sains. Ceux-ci agissent au niveau de la zone marginale en restant eux-mêmes dans l'aire endodermique. La démonstration est faite en injectant dans les blastomères végétatifs greffés, des marqueurs fluorescents qui ne diffusent pas. Ils ne se retrouvent que dans les descendants de la cellule injectée. On laisse l'embryon se développer jusqu'au stade neurula. À ce stade, le repérage en microscopie à fluorescence des lignées cellulaires descendantes des blastomères marqués montre qu'elles sont toutes dans l'endoderme du tube digestif.

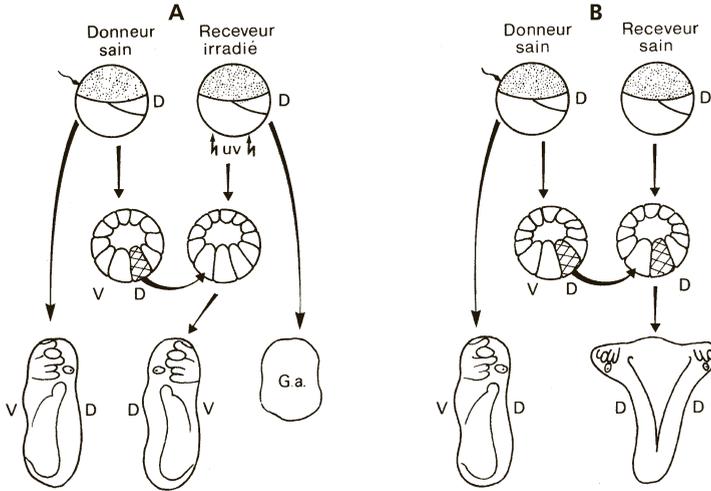


Figure 12.6 - Rôle du cytoplasme dorso-végétatif de l'œuf dans la détermination du mésoderme dorsal chez la blastula d'Amphibien.

A : Après irradiation du pôle végétatif, l'œuf se segmente, mais il n'y a plus de polarité dorsale et la gastrula est atypique (Ga). Le remplacement d'un blastomère végétatif de l'œuf irradié par un blastomère dorsal sain (au stade de 64 cellules) restaure le développement normal. La polarité de l'embryon ainsi opéré sera fonction de la position du blastomère greffé. **B :** Si l'expérience est pratiquée sans irradiation, en remplaçant un blastomère ventral par un blastomère dorsal, il se formera un second centre organisateur et il se développera un embryon double (d'après Gimlich et Gehrart, 1984).

12.5.3 L'induction du mésoderme se déroule de façon progressive pendant la segmentation (Nieuwkoop et coll., 1965 à 1973) (fig. 12.7)

À la mi-blastula, il existe donc une bande subéquatoriale, la **zone marginale** déjà déterminée qui chevauche les territoires endodermique et mésodermique. Si elle est isolée et cultivée *in vitro*, sa différenciation coïncide plus ou moins avec sa destination présomptive : elle forme du mésoderme axial entouré par de l'endoderme avec parfois de l'épiderme et du tissu nerveux.

Si, après avoir enlevé cette bande chirurgicalement, les calottes animale et végétative sont ressoudées et cultivées ensemble, une nouvelle aire mésodermique se reconstitue au contact des deux calottes et la gastrulation aura lieu avec apparition de mésoderme axial et para-axial (corde, somites) et latéral (fig. 12.7B).

Il s'agit encore, dans cette expérience, de la poursuite d'une action inductrice exercée par la calotte végétative (endoderme) sur la périphérie de la calotte animale et non d'une migration cellulaire. On le montre en recombinant de façon croisée les territoires de deux embryons dont l'un a incorporé de la thymidine ³H et l'autre non (embryon « froid »). Les bandes équatoriales sont supprimées comme précédemment (fig. 12.7C).

Dans une première recombinaison hémisphère végétatif ^3H + hémisphère animal « froid », les embryons ont un endoderme qui est radioactif, mais l'ectoderme et le mésoderme ne le sont pas.

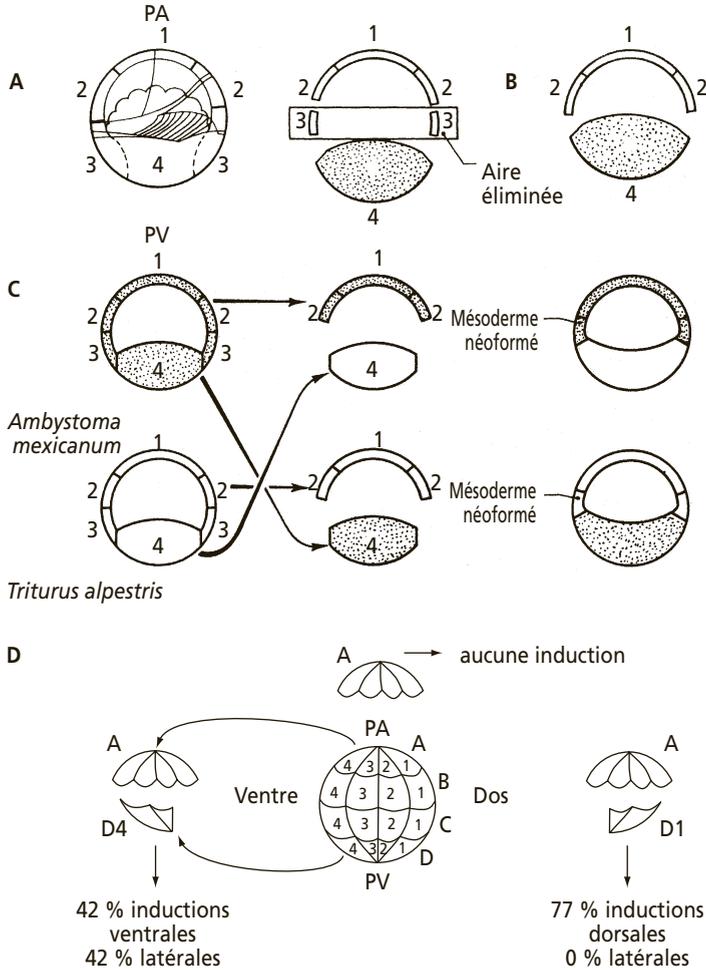


Figure 12.7 - Étude de la détermination de l'aire mésodermique chez des Amphibiens.

A : Schéma des aires délimitées par Nieuwkoop sur une blastula. **B** : Élimination de l'aire n° 3. La recombinaison 1+2+4 donne un embryon complet. **C** : Origine du mésoderme néoformé après ablation de la zone 3. *A. mexicanum* est marqué à la thymidine ^3H . Dans les recombinaisons avec *T. alpestris*, non marqué, le mésoderme est marqué si la cape 1 + 2 était marquée. Dans la combinaison contraire, il n'est pas marqué. **D** : Différenciations observées dans une calotte animale de blastula de xénope au stade 32 cellules cultivée soit isolément, soit en association avec un blastomère végétatif dorsal (D1) ou ventral (D4). PA : Pôle animal, PV : Pôle végétatif (d'après Dale et Slack, 1987, simplifié).

Dans la deuxième recombinaison hémisphère végétatif « froid » + hémisphère animal ^3H , les embryons qui se forment ont un mésoderme et un ectoderme qui sont radioactifs, l'endoderme ne l'est pas.

Ces marquages montrent que **les formations mésodermiques ne proviennent pas de l'endoderme**. Elles ont donc été déterminées dans la calotte de l'hémisphère animal.

À ce stade, l'endoderme au contact duquel sont induites les formations mésodermiques est polarisé dorso-ventralement. La démonstration résulte d'une série de recombinaisons : les blastomères végétatifs de jeune blastula de xénope au stade 32 cellules, appartenant au territoire endodermique, sont isolés de façon à obtenir les blastomères dorsaux, ventraux et latéraux (Dale et Slack, 1987) ; un (ou plusieurs) d'entre eux est (sont) recombiné(s) avec l'ensemble des 8 blastomères du pôle animal, à destinée ectodermique (fig. 12.7D). Il se différencie, dans cette coiffe, du mésoderme dont les caractéristiques régionales correspondent à celles des blastomères végétatifs auxquels elle est associée : c'est au contact de l'endoderme dorsal qu'apparaissent les formations typiques du mésoderme axial et para-axial (corde et somites) ; au contact de blastomères ventraux se différencient des structures ventro-latérales. Les blastomères dorso-végétatifs sont donc les inducteurs de mésoderme axial ; la région ventrale de l'endoderme se comporte aussi comme un inducteur de mésoderme ventral, les formations intermédiaires sont le résultat d'une action combinée de ces deux inductions.

12.5.4 Formation du centre de Nieuwkoop

Elle est en relation avec la rotation de symétrisation. Cette rotation redistribue des facteurs de transcription dans l'aire végétative suivant une polarité dorso-ventrale.

L'entrée du spermatozoïde dans l'œuf provoque la **rotation de symétrisation**, avec un déplacement du cytoplasme cortical d'environ 30° par rapport au cytoplasme interne, de telle façon que des éléments du cytoplasme cortical végétatif se trouvent redistribués dans la totalité du cortex dorsal, avec une concentration maximale dans sa partie végétative. Des rangées parallèles de microtubules forment une voie dans l'hémisphère végétatif le long de laquelle des organites du cortex et du cytoplasme végétatif se déplacent vers la face dorsale suivant une ampleur de 60° à 90° (voir § 8.1.4). Des facteurs de transcription qui sont répartis dans l'œuf non fécondé suivant une polarité axiale animale-végétative sont redistribués après la rotation de symétrisation avec une dissymétrie dorso-ventrale et se trouvent concentrés dorsalement, essentiellement dans quelques blastomères végétatifs qui constituent le **centre de Nieuwkoop**. Si la rotation de symétrisation est empêchée par une irradiation du pôle végétatif par des rayons UV ou toute substance qui altère les microtubules, les molécules actives dans la dorsalisation de l'embryon, telle la β -caténine, se retrouvent au pôle végétatif ; c'est alors là que les gènes dorsalisants *siamesis* et *goosecoid* sont exprimés au stade de la blastula, en position anormale, et finalement la gastrulation avorte (voir pages suivantes).

Des protéines régulatrices présentes dans les blastomères du centre de Nieuwkoop sont capables d'induire la formation d'un centre inducteur dans l'aire de la calotte animale qui leur est adjacente, le **centre organisateur de Spemann et Mangold** appartenant au futur mésoderme dorsal sans qu'y participent les blastomères végétatifs eux-mêmes ni les cellules qui en dérivent. Dans les blastomères ventro-végétatifs, on a aussi identifié d'autres déterminants qui induisent des structures mésodermiques ventrales. Certains des résultats de Gimlich et Gehrart (1984) montrent cependant que les blastomères dorsaux végétatifs ont aussi une certaine activité caractéristique du centre de Nieuwkoop. Il pourrait exister une superposition des deux centres, leurs fonctions distinctes se succédant dans le temps.



La succession d'événements qui se déroulent depuis la fécondation pour aboutir à la dorsalisation de l'embryon est complexe et son interprétation partiellement hypothétique. Les inductions se poursuivent après la transition blastuléenne, pendant la gastrulation, lorsque le mésoderme axial vient au contact de l'ectoderme dorsal pour induire les formations neurales tandis que le mésoderme ventral induira la différenciation de l'épiderme. Cette succession d'inductions est présentée fig. 12.8. Son interprétation sera sans doute sujette dans l'avenir à bien des ajustements.

On examinera dans ce qui suit, après l'étude du rôle de VegT dans la détermination de l'endoderme, l'induction du mésoderme chez la blastula. Nous verrons d'abord le mécanisme proposé le plus récemment impliquant la β -caténine et le gène *siamois* puis le mécanisme contrôlé par Vgl et l'activine, plus anciennement établi, ces derniers ne s'excluant pas mutuellement.

12.5.5 Rôles du facteur de transcription VegT dans la détermination de l'endoderme et l'induction du mésoderme

a) Le gène du facteur de transcription VegT est transcrit précocement pendant l'ovogenèse

À la fin de celle-ci, les ARN-m *VegT* se situent dans la région du cortex végétatif de l'ovocyte et donc dans le territoire endodermique. *VegT* intervient dans la détermination de l'endoderme puis du mésoderme : en effet, la neutralisation expérimentale du gène de VegT par des séquences nucléotidiques antisens entraîne l'expression de marqueurs mésodermiques et neuraux dans l'endoderme ; en revanche, sa surexpression dans l'ectoderme y induit l'apparition de marqueurs endodermiques.

Dès la fécondation et pendant la segmentation, VegT, ainsi que d'autres déterminants maternels, activent une série de gènes précoces spécifiques de l'endoderme : gènes de facteurs de transcription (*Xsox17*, *Mx1*, etc.) et de facteurs de croissance de la famille des TGF- β (*Xnr*, *Derrière*, *activine*, *Vg1*) dont l'expression est renforcée après la mi-blastula. Les produits de ces gènes induisent en outre dans la zone marginale, l'expression de gènes de facteurs de transcription par le génome embryonnaire, tels *Xbra* et *VegT*. Les produits de ces derniers, *Xbra* et VegT (sous sa forme zygotique) se maintiennent pendant l'induction du mésoderme.

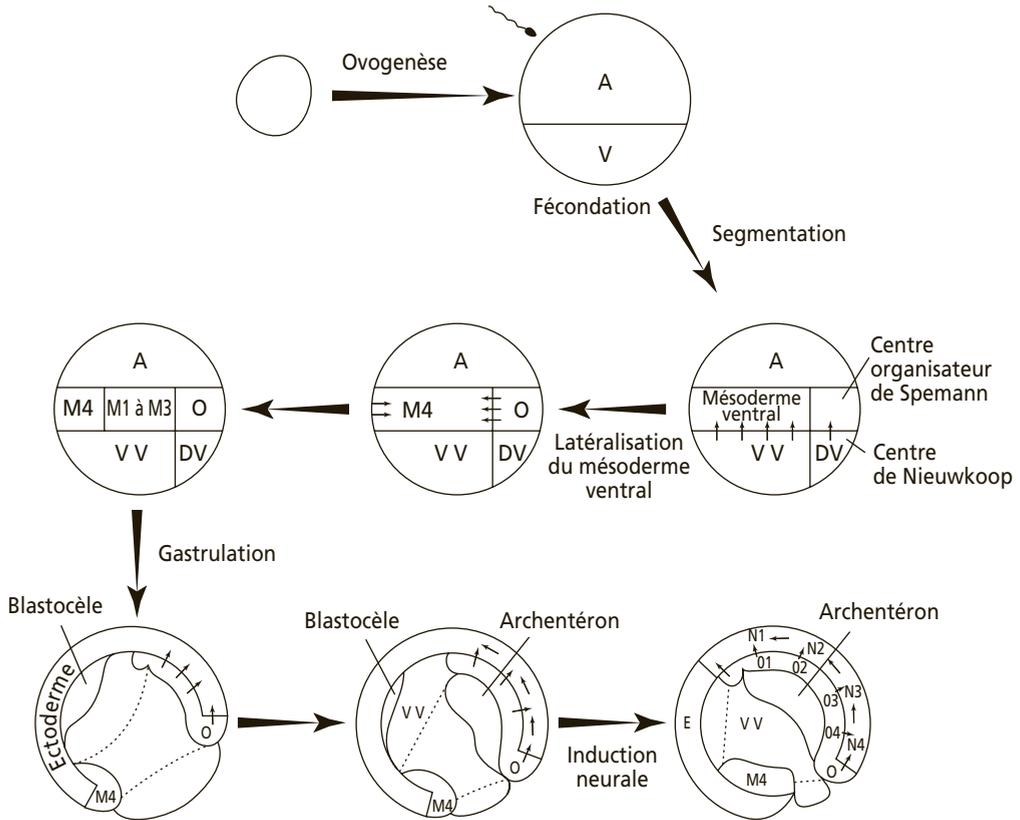


Figure 12.8 - Représentation schématique de la séquence des inductions dans la blastula et la gastrula du xénope.

À partir d'un ovocyte présentant une polarité animale-végétative (A, V) acquise pendant l'ovogenèse, la fécondation détermine une dorsalisation dans le cytoplasme végétatif (DV). Pendant la segmentation, cette zone dorso-végétative ou centre de Nieuwkoop induit une aire mésodermique dorsale, le centre organisateur de Spemann, et l'aire ventrale végétative (VV) induit un mésoderme ventral. Dans le mésoderme, des interactions entre le centre organisateur (O) et le mésoderme ventral (M4), établissent la détermination du mésoderme latéral, (M1 à M3). À la gastrulation, l'organisateur de Spemann est polarisé dans le sens cranio-caudal (O1 à O4) ; il induit des structures neurales cranio-caudales (N1 à N4) dans l'ectoderme dorsal en transmettant des informations verticales, du mésoderme vers l'ectoderme, et des informations horizontales au sein du neurectoderme. La différenciation épidermique (E) est induite par le mésoderme ventral (M4) (d'après Smith, 1985, et Slack et Tannahill, 1992).

b) L'induction du mésoderme dépend de VegT, forme maternelle puis zygotique

L'induction se réalise avant la transition blastulénne, période durant laquelle c'est la forme maternelle de VegT qui est active. Des expériences provoquant un épuisement des transcrits *VegT* par l'emploi d'oligonucléotides antisens montrent que ces ARN-maternels sont nécessaires pour la formation de 90% des tissus mésodermi-

ques (Kofron et coll., 1999). En effet, chez les embryons normaux, une activation des gènes *Xnr-1*, *Xnr-2* et *Xnr-4*, ainsi que le gène *Derrière* est détectée, tandis que chez les embryons expérimentaux on constate une absence des structures mésodermiques. Une surexpression des produits de ces gènes chez les embryons traités rétablit le mésoderme et les structures axiales (Agius et coll., 2000).

Après la transition blastuléenne, les gènes *VegT* et *Derrière* continuent à s'exprimer dans le mésoderme et/ou l'endoderme en régulant leur expression mutuelle puis finalement dans le seul mésoderme.

VegT sous sa forme zygotique peut être activé par l'activine. Son domaine de distribution s'étend d'abord au-dessus de la région de la future lèvre blastoporale, puis latéralement et ventralement, marquant ainsi le mésoderme latéral et ventral suivant le même patron d'expression que *Xbra*, sauf au niveau de la corde où *VegT* ne s'exprime pas. En position ectopique, *VegT* induit la formation de lèvres blastoporales surnuméraires.

À la mi-blastula, *Derrière* est exprimé dans le mésoderme et l'endoderme ; à la gastrulation, son domaine d'expression se restreint au mésoderme dans une aire identique à celle où *VegT*, son inducteur est présent. Il induit l'expression de marqueurs mésodermiques comme *Xbra*, mais aussi des marqueurs neuraux et endodermiques. Ses modes de régulation sont complexes. Il peut induire un axe partiel en position ventrale s'il est surexprimé en position ectopique. Les embryons mutants déficients pour ce gène présentent des anomalies du tronc comme l'absence de somites et de queue (White et coll., 2002).

L'induction du mésoderme est le résultat de l'activité de déterminants maternels puis de TGF- β zygotiques qui provoquent une cascade de régulations dans l'aire végétative et marginale. Dans le même temps, depuis la fécondation s'organise la dorsalisation de l'embryon.

12.5.6 La β -caténine, facteur de transcription actif dans la dorsalisation de l'embryon

La β -caténine est uniformément répartie dans le cytoplasme de l'ovocyte. Après la rotation de symétrisation, c'est la première des protéines régulatrices à être détectée dans l'aire dorsale avant l'apparition d'autres qui joueraient aussi un rôle dans l'induction du mésoderme dorsal. La β -caténine est le produit de transcription d'un gène à homéoboîte ; elle peut exercer des fonctions multiples : c'est une protéine d'ancrage des cadhérines de la membrane cellulaire (voir § 13.2.2e), c'est aussi un facteur de transcription nucléaire qui, ici, peut réguler de nouvelles transcriptions d'ARN-m dès la mi-blastula. Pendant la rotation de symétrisation, elle s'accumule dans la région dorsale de l'œuf. Cette concentration se poursuit pendant la segmentation jusqu'à la mi-blastula ; dès les stades 16-32 cellules on la retrouve dans les noyaux des cellules de la région dorso-végétative et plus spécifiquement dans celles du centre de Nieuwkoop. Elle ne se concentre pas dans les noyaux ventraux.

La β -caténine serait nécessaire et suffisante pour provoquer la formation d'un axe dorsal chez l'embryon (Moon et Kimelman, 1998). Ce rôle est démontré par un certain nombre d'expériences dont on citera deux exemples. L'injection de son ARN-m dans une blastula de xénope au stade 32 cellules, dans des blastomères de la région ventrale végétative, détermine la formation d'un axe dorsal secondaire à partir des cellules de l'aire animale qui sont les voisines immédiates des blastomères injectés. D'autre part, l'inhibition de la transcription des ARN-m de la β -caténine dans l'ovocyte provoquée par l'injection d'oligonucléotides antisens bloque toute formation dorsale dans l'embryon.

12.5.7 Mécanismes contrôlant la concentration de la β -caténine dans l'aire dorsale. Rôle des protéines Wnt (fig. 12.9)

Cette concentration relative de la β -caténine dans l'aire dorsale est due au fait que, dans les cellules ventrales de la blastula, elle est dégradée par le système du protéasome, à la suite de sa phosphorylation par la **glycogène synthétase kinase-3 (GSK-3)**. Si cette dégradation est stimulée dans la région dorsale de la jeune blastula par la surexpression de l'enzyme, il ne s'y forme pas d'axe dorsal ; si la synthèse de l'enzyme est diminuée expérimentalement dans la région ventrale, il s'y développe des formations axiales ectopiques. Le cantonnement de l'activité de la glycogène synthétase kinase à la région ventrale, alors que cette enzyme est présente dans la totalité de l'embryon, est due à son inhibition locale dans la région dorsale.

La GSK-3 empêche, en la phosphorylant, la dissociation de la β -caténine d'un complexe moléculaire comportant la protéine APC (pour « Adenomatous Polyposis Coli »). Celle-ci, en ubiquitinylant la β -caténine, provoque sa dégradation par le protéasome 26S. Des régulateurs de la **voie Wnt**, en modulant l'action de la GSK-3 sur la β -caténine, contribuent à empêcher sa dégradation. Des expériences modifiant la répartition de ces protéines ou neutralisant leurs récepteurs provoquent des perturbations dans la formation d'un axe dorsal.

Après la rotation de symétrisation (voir § 8.1.4), des protéines Wnt localisées dans l'aire dorsale interviennent indirectement dans l'inhibition de GSK-3. Le signal Wnt active Dishevelled (Dsh), un répresseur de la glycogène synthétase kinase-3 (fig. 12.9).

Les protéines Wnt agissent comme des facteurs de croissance. A ce stade du développement, Wnt1 est active. Wnt8 qui possède un pouvoir ventralisant ne sera transcrite qu'après la mi-blastula (voir § 15.3.3). La voie de signalisation Wnt est de toute manière fonctionnelle dans la jeune blastula chez laquelle on a en effet montré l'existence du récepteur Frizzled (Xfr7), spécifique de Wnt, codé par le génome maternel (Sumanas, 2000). L'implication de cette voie de signalisation dans la dorsalisation est attestée par le fait que les embryons chez qui la synthèse du transcrite de Frizzled est déficiente présentent des lacunes dans la formation de leur mésoderme dorsal.

Au cours de la dorsalisation, Wnt1 en se liant à son récepteur membranaire Frizzled active, dans l'aire dorsale, la protéine Dishevelled en la phosphorylant. Activée, celle-ci agit en entraînant l'inhibition de GSK-3, ce qui a pour conséquence la non-phosphorylation de la β -caténine, sa dissociation du complexe contenant APC, et finalement son accumulation.

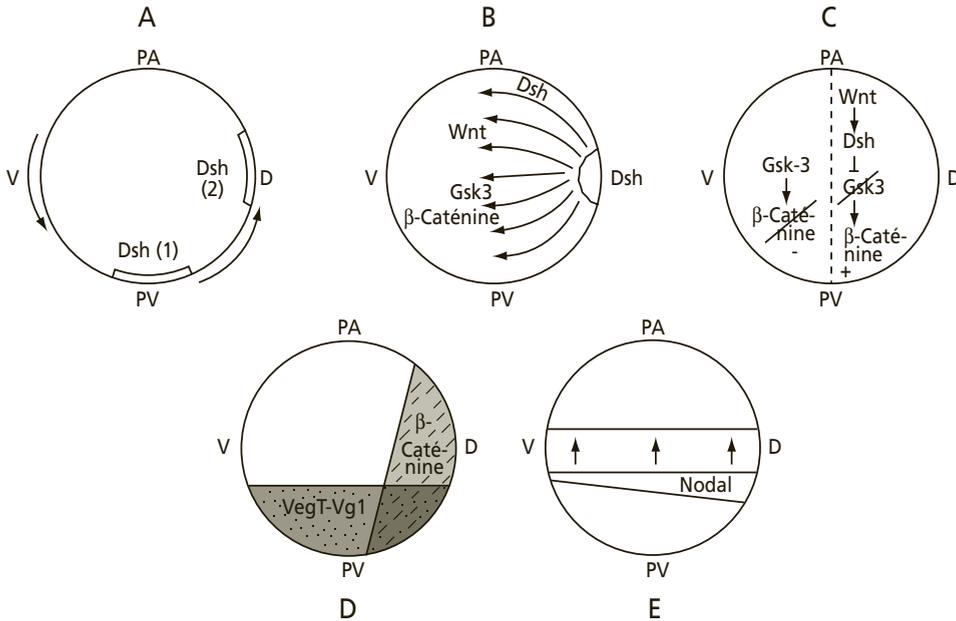


Figure 12.9 - Établissement d'un gradient dorso-ventral de β -caténine et de Nodal (Xnr) dans une blastula d'Amphibien.

A : À la fécondation, Dishevelled (Dsh) qui se trouvait localisé dans le cytoplasme cortical du pôle végétatif (1), se trouve entraîné dans la région dorsale (2) par la rotation de symétrisation.

B : Dsh diffuse alors dans le cytoplasme de l'ovocyte et se répartit suivant un gradient de concentration décroissante dorso-ventral, la β -caténine et GSK-3 étant présents dans l'ensemble du cytoplasme.

C : Au cours de la segmentation, dans les cellules de l'aire dorsale, GSK-3 est inhibée par la voie Wnt active en présence d'un taux élevé de Dsh. La β -caténine se trouve alors conservée. Dans l'aire ventrale, où Dsh est peu concentré, la voie Wnt est peu active, GSK-3 n'est pas inhibée et la β -caténine est dégradée.

D : La β -caténine se trouve ainsi plus concentrée dans l'aire dorsale. Dans l'hémisphère végétatif, VegT et Vg1 sont répartis de façon homogène. Dans la zone où se superposent VegT, Vg1 et la β -caténine – l'aire dorso-végétative – les gènes nodal s'expriment le plus intensément.

E : Un gradient dorso-ventral d'expression de Nodal est ainsi établi qui, avec d'autres facteurs, induit le mésoderme au niveau de la zone marginale (voir fig.12.10).

D'abord localisée dans le cortex végétatif de l'œuf, Dsh se retrouve en position dorsale à la suite de la rotation de symétrisation. C'est ainsi que la dégradation de la β -caténine par la glycogène synthétase kinase ne se produit que dans la région ventrale. Dans la région dorsale où elle reste abondante, la β -caténine pénètre dans les noyaux des cellules dorso-végétatives et se lie à des facteurs de transcription tels que Tcf-3. Ces protéines régulatrices activent et régulent, à la mi-blastula, l'expression de gènes à homéoboîte fortement dorsalisants comme *siamois* ou *twinn* (fig. 12.10).

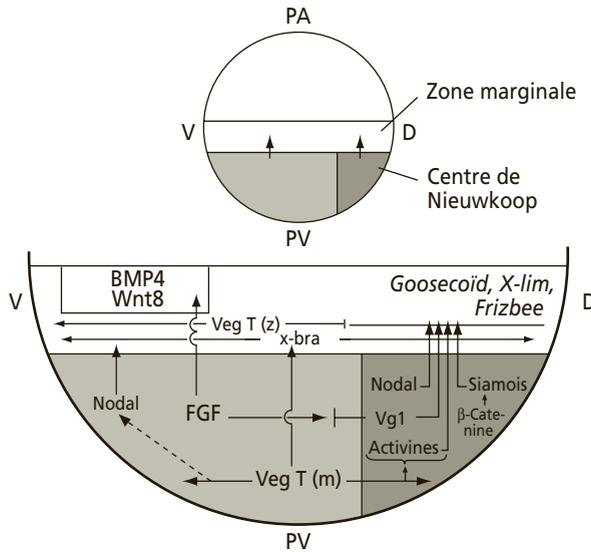


Figure 12.10 - Récapitulation des principales inductions connues émises par les cellules végétatives et aboutissant à la détermination du mésoderme dans l'aire marginale d'une blastula d'Amphibien.

Pendant la segmentation, le facteur maternel VegT-VegT(m) active, dans l'endothèque de la blastula l'expression des gènes TGF- β dont *nodal*, *Vg1*, les *activines*, ainsi que *VegT zygotique*-VegT(z)- et *Xbra* dans le mésoderme.

La β -caténine s'est concentrée dorsalement dans le centre de Nieuwkoop (fig. 12.9) ainsi que *Nodal* (*Xnr*), *Vg1* et les *activines*. Elle y induit l'expression de gènes dorsalisants, comme *siamois*.

L'ensemble des gènes du centre de Nieuwkoop active les gènes dorsalisants du centre organisateur de Spemann et Mangold : *goosecoïd*, *X-lim*, *frizbee*, etc.

Présents dans l'endothèque ventrale, les FGF activent *BMP4* et *Wnt8* dans la zone marginale ventrale et latérale. L'expression simultanée de *Vg1* et des FGF dans le même territoire est incompatible, *Vg1* neutralisant les FGF.

12.5.8 Interventions de *Vg1*, de l'activine et de *Nodal*, en synergie avec *Siamois*, dans l'induction du mésoderme dorsal

a) Le gène *siamois*

Ce gène est exprimé dans les cellules dorsales, végétatives et équatoriales du centre de Nieuwkoop sous l'action de protéines régulatrices, notamment la β -caténine. Le transcrit *siamois* n'est pas un ARN-m maternel, il n'a été identifié qu'au moment de la transition blastulienne. Son injection dans blastomères végétatifs ventraux conduit au développement d'un embryon double (d'où son nom de *siamois*), sans que les cellules injectées participent aux structures induites.

Après sa synthèse, la protéine *Siamois* active à son tour d'autres gènes dorsalisants en se liant à leurs promoteurs. Parmi ces gènes dorsalisants on citera ceux

des facteurs de transcription, Goosecoïd et Xlim, et des protéines inductrices, sécrétions de type paracrine, comme Cerberus et Frizbee (protéine Frzb) (Engleka et Kessler, 2001).

On connaît d'autres gènes à homéoboîte proches de *siamois* par leur fonction et leur structure ; ils ont aussi une activité dorsalisante, sont activés par la β -caténine et Tcf-3 et leurs produits peuvent réguler *goosecoïd*. C'est le cas du gène *twin* (*Xtwin*) par exemple.

Cependant, *siamois* se révèle insuffisant pour induire à lui seul une expression suffisante de *goosecoïd* dans le futur centre organisateur de Spemann. Des membres de la famille du TGF- β , tels que Vg1, des activines et des protéines Nodal agissent en synergie avec *Siamois*. *In vitro*, Vg1 et des activines induisent la différenciation de mésoderme dorsal. L'apport d'une de ces substances permet d'obtenir de la corde et des muscles avec, cependant, une efficacité variable.

b) La protéine Vg1

Vg1 est traduit à partir d'un ARN-m maternel et se trouve localisé dans le cytoplasme végétatif de l'œuf mûr ainsi que dans les blastomères végétatifs sous forme d'un précurseur inactif. La protéine Vg1 est activée dans la région du cortex dorsal, probablement par une protéase, lors de la rotation de symétrisation, à l'emplacement où se forme le croissant gris (Melton, 1993). Elle est alors capable d'induire des formations mésodermiques dorsales dans les cellules de la coiffe animale isolée et cultivée *in vitro*. L'ARN-m *Vg1*, injecté dans un blastomère végétatif ventral d'une morula, peut induire la formation d'un axe surnuméraire. Un œuf irradié aux UV se développe en un embryon dépourvu d'axe dorsal par défaut de migration des inducteurs, mais l'injection d'ARN-m *Vg1* dans un des blastomères végétatifs dorsaux restaure cette capacité.

La nature des formations mésodermiques induites par la protéine Vg1 dépend de sa concentration. Dans une culture de calottes animales, on obtient en effet, avec des doses décroissantes de Vg1, une expression différentielle de gènes marqueurs de structures mésodermiques. Seront ainsi exprimés dans l'ordre, *goosecoïd* et *noggin* (structures dorsales axiales), puis *Xwnt8* et *actine* (structures latérales) et enfin uniquement *Brachyury* (totalité du mésoderme).

La protéine Vg1 n'a pas cependant la capacité d'induire à elle seule la différenciation du centre organisateur de Spemann ; en effet, elle ne peut induire la différenciation d'une corde *in vivo*.

La protéine Vg1 se trouve aussi chez les autres Vertébrés, comme l'embryon de poulet, chez lequel elle est localisée dans la zone marginale postérieure de la blastula qui est l'homologue du centre de Nieuwkoop.

c) Les activines

Ce sont des protéines très voisines de la protéine Vg1. Certains récepteurs membranaires pourraient accepter l'une ou l'autre de ces protéines. Cependant, une mutation affectant un récepteur qui n'interfère pas avec Vg1, provoque des

inhibitions de structures mésodermiques dorsales (Dyson et Gurdon, 1997). L'activine a donc bien un rôle spécifique dans l'induction du mésoderme dorsal, à côté de Vg1.

Dans ces expériences, l'activine A, purifiée à partir d'extraits d'embryons de xénope, induit la synthèse d'actine musculaire à des doses de 2ng/ml. Quoique des transcrits d'activine B n'apparaissent qu'après la transition blastuléenne, on ne peut exclure un rôle de cette activine dans l'induction du mésoderme ; en effet, les cellules folliculeuses synthétisent en abondance cette molécule, et l'ovocyte peut la capturer. Ajoutée à une culture de calottes animales, chez le xénope, l'activine B induit l'expression du gène *Brachyury*, caractéristique du mésoderme, et la formation de mésoderme axial qui induira à son tour des structures neurales (Sokol et coll., 1990). Cependant, l'injection d'activine dans un blastomère ventral peut, à elle seule, provoquer la formation de structures neurales antérieures.

Ce rôle de l'activine a aussi été démontré chez l'embryon de poulet.

d) Nodal (chez la souris) et Xnr (chez le xénope)

Ce sont également des membres de la famille des TGF- β qui jouent un rôle déterminant. Celui-ci est plus particulièrement démontré dans une expérience où une coiffe animale de jeune blastula de xénope est associée aux cellules de l'hémisphère végétatif, suivant la technique de Nieuwkoop (voir description § 12.5.3) : quand on ajoute dans l'hémisphère végétatif un inhibiteur spécifique de **Nodal**, alors que les facteurs **Vg1**, **VegT** ou l'**activine** ne sont pas inhibés, l'induction du mésoderme échoue (Agius et coll., 2000).

Chez la blastula plus âgée, des protéines Nodal (Xnr-1, Xnr-2, Xnr-4), sont exprimées suivant un gradient décroissant dorso-ventral dans l'endoderme. Ce gradient résulte de l'activité inégale des gènes de la famille *nodal*, ceux-ci étant eux-mêmes régulés par l'action synergique d'une part de VegT et Vg1 répartis de façon égale dans l'aire végétative, et d'autre part de la β -caténine concentrée dans l'aire dorsale.

Nodal (*Xnr*) étant exprimé suivant un gradient dorso-ventral dans l'endoderme, son produit activera, en synergie avec Siamois, les gènes responsables de la synthèse des protéines du centre organisateur de Spemann et notamment de Goosecoïd dans la région dorsale où la concentration de Nodal est la plus forte.

Au moment de la gastrulation, il semble que la protéine Nodal soit nécessaire pour que la migration des cellules du mésoderme dorsal puisse se dérouler normalement. En effet, la ligne primitive ne se forme pas chez des souris mutantes, déficientes pour le gène *nodal*. Chez le xénope, les protéines Xnr qui ont participé à l'induction du centre de Nieuwkoop sont présentes avec une plus forte concentration dans le mésoderme dorsal au moment de la gastrulation.

Les aires mésodermiques ventrale et latérales se déterminent également en relation avec la concentration en protéine Nodal. Dans la région ventrale, où celle-ci est faible, les taux de BMP4 et Xwnt8 sont élevés ; ils vont en décroissant vers la région dorsale, en raison inverse de la concentration de Nodal.

En résumé

Dans un mésoderme induit par l'endoderme exprimant VegT, la β -caténine est un facteur de transcription qui se révèle actif dans la dorsalisation de l'embryon. Elle se trouve concentrée dans l'aire dorsale : cette localisation est le résultat de l'action de la voie Wnt, qui est localisée dans la région dorsale après la rotation de symétrisation, et qui contrôle l'inhibition de l'enzyme indirectement responsable de la dégradation de la β -caténine.

Dans le mésoderme dorsalisé, Siamois active des facteurs de transcription dorsalisants, comme Goosecoid. Il agirait en synergie avec d'autres membres de la famille du TGF- β , comme Vg1, des activines et Nodal, chacun de ces facteurs étant insuffisant à lui seul pour mettre en place un centre organisateur fonctionnel.

12.5.9 Synthèse des FGF inducteurs du mésoderme ventral et latéral par les blastomères végétatifs ventraux

a) Mise en évidence du rôle du FGF dans la détermination du mésoderme ventral et latéral

Les ARN-m des facteurs de croissance actifs dans l'induction du mésoderme sont d'origine maternelle puisque leurs produits sont synthétisés et actifs avant la transition blastuléenne. Des FGF sont sécrétés et agissent à faible distance. En présence de pratiquement tous les FGF (une grande partie des expériences porte cependant sur les FGF basiques), il se différencie du mésoderme de type ventral ou latéral dans les calottes animales de blastula cultivées *in vitro*, sous forme de vésicules épithéliales, de mésenchyme et d'éléments sanguins. Le gène *Brachyury*, dont l'expression est caractéristique de tout le mésoderme y est également exprimé. De plus, l'ARN-m d'une actine cardiaque (nom donné à une actine musculaire de type embryonnaire), est également transcrit avec de fortes doses de FGF. Il ne se forme jamais de mésoderme axial du type corde.

b) Antagonisme entre FGF et Vg1

Chez des embryons dont les récepteurs aux FGF sont neutralisés par la compétition d'une forme tronquée dominante (voir encart 11.1), l'action inductrice des FGF est inhibée et les formations mésodermiques latérales et ventrales sont fortement réduites au détriment des formations dorsales. On peut penser que, dans les conditions normales de développement, ces FGF rendraient les cellules marginales insensibles à l'action dorsalisante de Vg1. Celui-ci n'intervient dans l'induction du mésoderme dorsal que si la concentration en FGF est faible mais, si elle s'élève, il n'apparaît plus que des formations latérales puis ventrales.

c) Synthèse de BMP4 induite par les FGFs

Dans le mésoderme, la synthèse de cette protéine détermine la différenciation de structures mésodermiques ventrales.

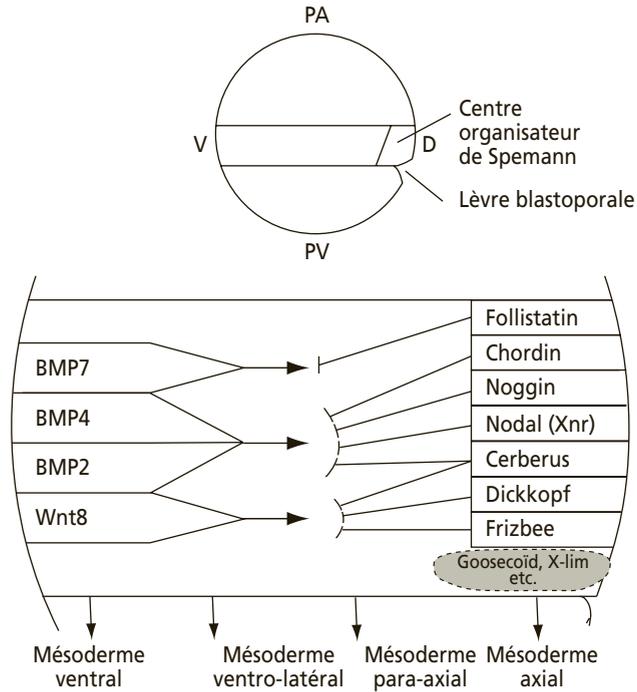


Figure 12.11 - Relations au sein du mésoderme entre les facteurs de transcription dorsaux, les protéines inductrices dorsales et les protéines ventrales chez la blastula âgée et la jeune gastrula d'Amphibien ; conséquences sur les spécifications mésodermiques.

Dans le centre organisateur de Spemann, les facteurs de transcription (Goosecoïd, X-Lim, etc.) activent la synthèse de protéines inductrices (follistatin, Chordin, Noggin, Nodal, Cerberus, Dickkopf, Frizbee). En diffusant latéralement dans le mésoderme, celles-ci induisent des structures axiales et para-axiales et limitent le champ d'action de protéines inductrices de structures ventrales (BMP2, BMP4, BMP7, Wnt8). PA : Pôle animal ; PV : Pôle végétatif ; D : Face dorsale ; V : Face ventrale.

Les ARN-m de BMP4 sont présents avant la transition blastulienne et se trouvent dans tout l'ectoderme et le mésoderme de la blastula âgée. Chez les Amphibiens, la protéine BMP4 induit des différenciations de type ventro-latéral dans tout le mésoderme et réprime la formation de mésoderme dorsal (Dale et coll., 1992). Dans des embryons et des coiffes animales où la synthèse de BMP4 est expérimentalement suractivée par des injections d'ARN-m en excès, on trouve abondamment exprimés des gènes du mésoderme ventral (*XWnt8*, *XMyoD*). Chez les embryons ainsi traités, l'organisateur de Spemann est ventralisé avec un degré anormalement élevé de synthèses d'ARN-m *XWnt8*, et une faible expression d'ARN-m *goosecoïd* dont le produit est un marqueur du mésoderme dorsal (voir § 15.3.2-3).

Plusieurs résultats récents montrent que l'induction de structures ventrales est plutôt le résultat d'une action conjuguée d'hétérodimères de BMP, combinaisons de BMP2, BMP4 et BMP7.



La protéine Wnt8 (Xwnt8 chez le xénope), ne se trouve que dans la zone marginale ventrale et latérale au moment de la gastrulation. Elle a un rôle dans la formation du mésoderme ventral. Son intervention est assez tardive, le gène n'étant transcrit qu'après la transition blastulénne. Elle sera étudiée au moment de la gastrulation (voir § 15.3.3).

Les processus d'induction du mésoderme décrits ci-dessus chez la blastula se poursuivent chez la jeune gastrula. On peut les résumer dans un schéma, la figure 12.11, qui présente également les relations mises en évidence entre des protéines inductrices dorsales et ventrales. Ces relations seront examinées au début de la gastrulation (voir chap. 15).

12.6 SYNTHÈSES D'ARN NOUVEAUX, EXPRESSION DU GÉNOME EMBRYONNAIRE

Les ARN nouveaux qui sont synthétisés après la fécondation, plus ou moins tôt au cours de la segmentation, reflètent l'expression du génome de l'embryon, c'est-à-dire des gènes apportés aussi bien par le père que par la mère. La chronologie de l'activation du génome, par rapport à l'état de développement de l'embryon, est différente suivant les espèces.

- **Chez l'oursin**, on ne peut pas distinguer de limite nette entre le faible niveau des transcriptions d'ARN dans les pronucléi, avant leur fusion, et les transcriptions dans les premiers blastomères. On sait cependant qu'elles augmentent nettement dans la blastula moyenne (128 cellules).
- **Chez le xénope**, elle devient notable 7 h après la fécondation, après environ 12 cycles de mitoses, soit 4 000 cellules.
- **Chez la souris**, les premières synthèses commencent dès la première division et ne sont notables qu'à 3 jours, avec seulement 8-16 cellules.
- **Chez la drosophile**, elles commencent après la 10^e division, environ 2 heures 30 après la fécondation; elles sont notables dans le blastoderme après la 14^e division.

Dans tous les cas, les ARN nouvellement transcrits sont porteurs d'un programme de synthèse qui permet la poursuite du développement. Une étude plus qualitative de l'expression du génome embryonnaire sera développée dans le chapitre 16. Nous détaillerons ici le cas des Amphibiens et des Mammifères.

12.6.1 La transcription d'ARN nouveaux chez les Amphibiens est activée au moment de la transition blastulénne

Il y a très peu de synthèses d'ARN détectables chez l'embryon avant la transition blastulénne, tant que les divisions de segmentation sont synchrones, avec des cycles rapides dépourvus de phase G1 et pratiquement de G2. À la mi-blastula, le rythme mitotique se ralentit, les transcriptions des différentes classes d'ARN sont observées à peu près simultanément.

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

Ces ARN s'accumulent assez rapidement, car les milliers de noyaux de la blastula sont autant de sites de synthèses. Les ARN de petite taille, ARN-t et ARN 5S ribosomique, commencent à s'accumuler les premiers. Les ARN-t seront 15 fois plus abondants à la gastrulation que dans l'ovocyte.

a) Synthèse d'ARN ribosomiques

Les ARN-r nouveaux et les ribosomes où ils s'intègrent ne prennent que progressivement le relais dans la formation de polyribosomes et dans la traduction des ARN-m, ce qui fait que leur déficience peut d'abord passer inaperçue. L'observation du développement de xénopes homozygotes pour une mutation « anucléolée » le montre.



La mutation « anucléolée » est une mutation qui consiste en la délétion d'un des deux organisateurs nucléolaires. Les parents hétérozygotes (Nu/o) sont viables ; un quart de leur descendance sera double récessif o/o et sera incapable de synthétiser ses propres ARN-r à partir de la mi-blastula. Les embryons peuvent cependant atteindre le stade du bourgeon caudal car ils utilisent la réserve de ribosomes accumulés dans le cytoplasme de l'ovocyte, lorsque le génome maternel Nu/o était actif. On sait en effet qu'au stade bourgeon caudal, les ARN-r nouveaux ne constituent encore que 2,5 % des ARN-r provenant de l'ovocyte (Shiokawa et coll., 1981).

b) Synthèses des ARN-m zygotiques

Les synthèses d'ARN messagers commencent aussi à la mi-blastula, sous forme essentiellement d'ARN-m poly(A). Cette synthèse est quantitativement contrebalancée par la dégradation des ARN maternels. Il n'y a donc pas de forte augmentation globale avant la blastula âgée.

On a calculé que, comme chez l'oursin, le taux de transcription des ARN dans les noyaux des cellules d'embryons n'est pas très intense et ralentit progressivement au cours du développement. 1 à 3 % du génome est transcrit par noyau pour former les ARN nucléaires de poids moléculaire élevé, les ARN pré-messagers, dont 5 à 10% seulement sont exportés dans le cytoplasme comme messagers stables après excisions et épissages des exons. Il y aurait quelques milliers d'ARN-m différents dont certains avec peu de copies, d'autres avec de nombreuses copies par cellule. Ce remplacement des ARN-m maternels est progressif, ce qui fait que les inhibiteurs de synthèse d'ARN n'empêchent pas l'embryon d'atteindre la fin de la segmentation.

Par contre, ce sont les ARN nouveaux qui prédominent dès le début de la gastrulation. Des polyribosomes contenant des ARN-m nouveaux ont pu être isolés. Ils peuvent être traduits dans des milieux acellulaires (voir note encart 4.4), ce qui permet d'identifier facilement les protéines pour lesquelles ils codent. On a ainsi détecté des protéines nécessaires aux mouvements gastruléens, ce qui indique une préparation des mouvements morphogénétiques.

Des transcriptions d'ARN-m codant pour des inducteurs mésodermiques et neuraux débutent aussi à cette période ; ils peuvent être identiques à des ARN-m maternels déjà présents dans l'ovocyte, comme c'est le cas pour ceux des **activines**, de **Noggin**, de la **follistatine** et pour d'autres dont il sera question dans l'étude des

inductions pendant la gastrulation (voir chap. 15). D'autres ARN-m sont issus de gènes qui n'avaient pas été transcrits pendant l'ovogenèse et qui ne sont traduits qu'à partir de la transition blastuléenne ; c'est le cas des ARN-m *siamois*, *goosecoïd*, *chordin* et *cerberus*.

12.6.2 Les synthèses d'ARN sont activées dès le début de la segmentation chez les Mammifères

La reprise des synthèses d'ARN-m est très précoce avec des différences importantes entre les espèces. Elles sont très actives dès le stade 2 cellules chez la souris et le taux de synthèse des protéines s'accroît considérablement. Chez l'homme, les premiers ARN-m sont transcrits aux stades 4 à 8 cellules et chez la vache aux stades 8 à 16 cellules. Les synthèses d'ARN-r sont plus tardives. Elles débutent au stade 4 cellules chez la souris, 16 cellules chez le lapin dont l'œuf est plus volumineux et la segmentation plus rapide. L'inhibition de ces synthèses par l'actinomycine D provoque un arrêt du développement. Une activité nucléolaire précoce est indispensable dès le début de la segmentation. Ainsi, chez les mutants *T12* de souris, où la synthèse d'ARN nucléolaire est réprimée, le taux d'ARN ribosomiques est inférieur à la normale et le développement ne dépasse pas 30 cellules chez les homozygotes.

Résumé

Lors de la fécondation, chez les Amphibiens, la rotation de symétrisation crée une répartition dissymétrique de composants du cytoplasme végétatif, qu'on retrouve dans les blastomères dorso-végétatifs ; c'est le cas de *Dishevelled* dont la présence conditionne le fonctionnement de la voie Wnt. Des facteurs de croissance qui sont activés proviennent de la traduction d'ARN-m maternels ; ils sont répartis suivant une polarité dorso-ventrale. C'est ainsi que, dans l'aire végétative, à l'opposé du point de pénétration du spermatozoïde, se forme le centre de *Nieuwkoop* dont les sécrétions de protéines régulatrices induiront la formation du centre organisateur de *Spemann* et *Mangold*.

Les protéines inductrices dorsales les mieux connues sont la β -caténine, dont la distribution est régulée par la voie Wnt (*frizzled*, *glycogène synthétase kinase-3*) et qui active *siamois* et des TGF- β (activines, *Nodal*, *Vgl*). Ces derniers, avec la protéine *Siamois*, contribueraient à activer *goosecoïd* dans la partie dorsale de la zone marginale qui deviendra le centre organisateur de *Spemann*. L'ensemble de ces protéines déterminent la formation d'un territoire mésodermique polarisé dorso-ventralement. L'induction du mésoderme est progressive, de la région végétative vers la région animale.

L'aptitude à former des structures dorsales axiales dans le mésoderme de la blastula âgée décroît suivant un gradient dorso-ventral ; maximale au niveau du centre organisateur de *Spemann*, elle est liée au gradient de concentration de ces protéines inductrices, notamment de *Nodal*.

Résumé

D'autres inducteurs de structures ventrales, répartis suivant un gradient inverse ventro-dorsal dans l'aire végétative induisent dans la zone marginale des différenciations mésodermiques ventrales et latérales : ce sont VegT et des FGF qui activent la synthèse de protéines inductrices comme BMP4, Brachyury et Wnt8.

Le processus d'induction en direction de la calotte animale se poursuivra pendant la gastrulation grâce aux contacts nouveaux qui résultent des mouvements morphogénétiques. On verra que le mésoderme induit, venant au contact des tissus ectodermiques de la calotte animale, y induira à son tour des différenciations neurales ou épidermiques grâce à la sécrétion d'inducteurs nouveaux agissant en synergie avec certains de ceux qui viennent d'être étudiés.

Il existe l'équivalent d'un centre organisateur de Nieuwkoop chez tous les Vertébrés. Chez les Poissons Téléostéens (poisson zèbre), c'est une aire marginale autour du disque embryonnaire, chez les Oiseaux et les Mammifères, c'est la zone marginale postérieure où se rassemblent les cellules qui forment la ligne primitive (fig. 9.5 et 9.6). On retrouve toujours dans ces centres des substances organisatrices déjà présentes dans l'ensemble de l'ovocyte à l'état inactif et qui s'y regroupent après la fécondation. Les facteurs de croissance synthétisés et les gènes organisateurs qui sont exprimés sont quasiment identiques et possèdent des fonctions analogues chez tous les Vertébrés. Le découpage entre la formation du centre de Nieuwkoop, du centre organisateur de Spemann, et les inductions neurales est purement didactique. Il y a une continuité parfaite entre les phénomènes décrits ici et ceux qu'on verra plus loin.

La segmentation est la première phase de l'embryogenèse après la fécondation. Les mitoses qui se succèdent rapidement cloisonnent des cytoplasmes ovocytaires qui très fréquemment sont hétérogènes. La blastula est donc un assemblage de cellules dont le cytoplasme est diversifié, ce qui réagit sur la régulation de l'activité des gènes, les synthèses nucléaires et les spécialisations cellulaires. Cet état est le plus marqué chez les œufs à développement en mosaïque.

Pendant la segmentation, les premières protéines sont issues de la traduction des ARN-m transcrits pendant l'ovogenèse. L'embryon ne dépend pas immédiatement des premières transcriptions du génome embryonnaire. Celui-ci est activé plus ou moins tôt suivant les espèces et ses produits assurent la suite du développement. L'activation se situe dès la fécondation chez les Oursins ou les Mammifères, plus tardivement pendant la segmentation chez les Amphibiens et la drosophile. Les protéines synthétisées sont indispensables pour assurer la suite du développement (segmentation des œufs d'Oursins ou de Mammifères, gastrulation de l'embryon d'Amphibien).

Compartimentation et synthèses nouvelles aboutissent à des déterminations de territoires, soit spontanées, soit par interactions inductives, ce qui est notamment le cas de l'induction du mésoderme chez les Amphibiens.

Questions

- 12.1** À quel phénomène la transition blastuléenne correspond-elle ?
- 12.2** Existe-t-il des capacités de régulation des déficiences chez tous les embryons de Métazoaires ?
- 12.3** Quel est le type de processus privilégié lors des déterminations chez les embryons de Vertébrés ?
- 12.4** Qu'appelle-t-on œuf à développement mosaïque ?
- 12.5** Existe-t-il des exemples de déterminants cytoplasmiques responsables d'un devenir germinal des cellules qui les comporteraient ?
- 12.6** Existe-t-il des cas de régulation des déficiences dans l'espèce humaine ?
- 12.7** À quoi correspond le centre de Nieuwkoop ?
- 12.8** À quel moment du développement les inductions responsables de la détermination mésodermique se mettent-elles en place ?
- 12.9** Existe-t-il un lien entre les protéines issues du centre de Spemann et la régionalisation du mésoderme ?

Réponses page 389

13

MOUVEMENTS MORPHOGÉNÉTIQUES ET LEUR COORDINATION

PLAN

- 13.1 Modifications du cytosquelette
- 13.2 Cohésion cellulaire et molécules d'adhérence
- 13.3 Communications intercellulaires et coordination des mouvements cellulaires
- 13.4 Migrations cellulaires et matrice extra-cellulaire

Dès la fin de la segmentation, les mouvements morphogénétiques modifient les positions relatives des cellules de l'embryon. Des ensembles cellulaires se déplacent de façon coordonnée comme le mésoderme qui s'invagine dans le blastocèle pendant la gastrulation, ou le neurectoderme qui forme un tube s'isolant de l'ectoderme pendant la neurulation. D'autres cellules se déplacent isolément dans l'embryon comme celles des crêtes neurales ou comme les cellules germinales primordiales.

Ces mouvements impliquent des modifications dans le cytosquelette des cellules migratrices, une coordination entre les cellules d'un même feuillet par le jeu d'adhérences et de communications intercellulaires, les unes et les autres se modifiant en relation avec les mouvements cellulaires. Ils impliquent aussi l'existence d'un substrat sur lequel les cellules peuvent migrer et adhérer : la matrice extra-cellulaire.

13.1 MODIFICATIONS DU CYTOSQUELETTE

Les exemples que nous décrivons ont été choisis chez les Amphibiens.

13.1.1 Pendant la formation du blastopore (fig. 13.1)

À l'endroit où se forme le blastopore, au niveau de la lèvre dorsale, puis des lèvres latérales, des cellules appartenant à l'endoderme prennent une **forme en bouteille**.

Elles ont des faisceaux de microtubules orientés dans le sens de leur étirement et leur partie renflée qui est orientée vers la cavité du blastocèle adhère par l'intermédiaire de filopodes aux cellules du mésoderme qui, chez le xénope, sont situées plus profondément. Ces cellules possèdent une ceinture de microfilaments d'actine qui se trouve au pôle apical ; elle se contracte et il ne subsiste qu'un étroit pédoncule inséré

13 • Mouvements morphogénétiques et leur coordination

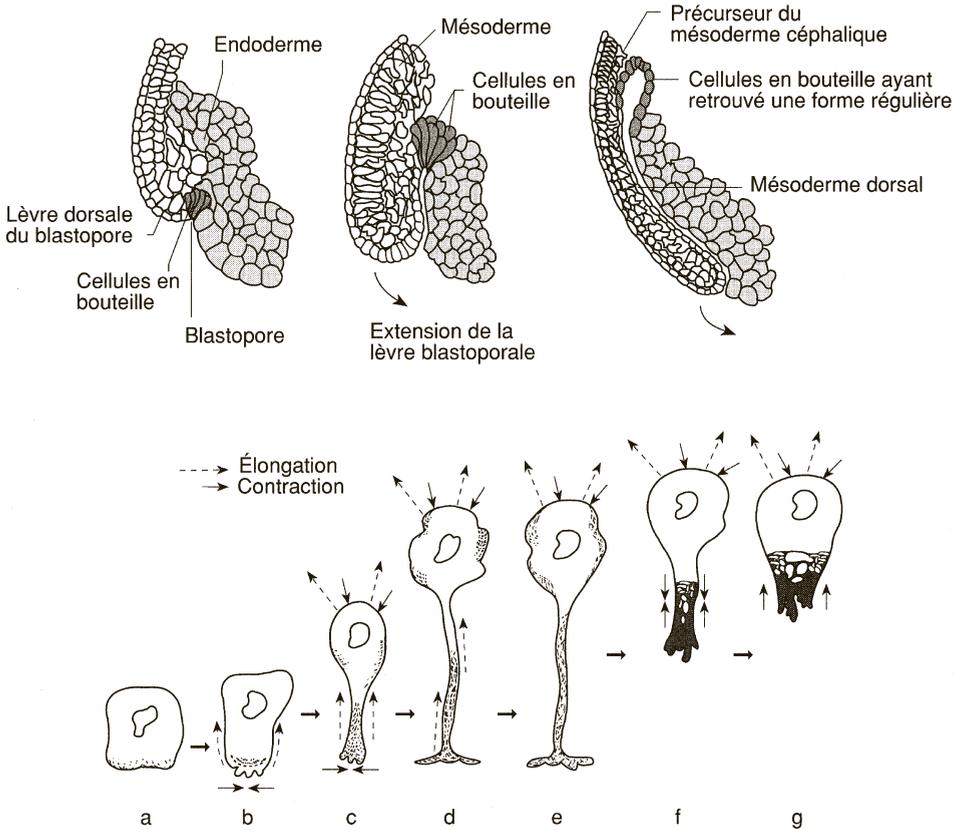


Figure 13.1 - Mouvements cellulaires au niveau de la lèvre blastoporale.

En haut : coupes longitudinales de lèvre blastoporale à trois stades de la gastrulation chez le xénope.

En bas : schéma théorique des modifications de forme que subissent les cellules (a) au niveau du blastopore pendant la gastrulation des Amphibiens. Ces cellules s'invaginent dans la cavité du blastocèle par allongement de leur extrémité proximale (b). Elles s'allongent, puis se contractent latéralement dans leur région superficielle (c, d), se raccourcissent par rétraction de leur partie distale (e, f, g). Pendant ces mouvements, toutes les cellules ont des contacts étroits entre elles (d'après Baker, 1965).

à la surface externe de l'embryon. Ce pédoncule se rétracte ensuite vers le corps cellulaire. Le mouvement coordonné de l'ensemble de ces cellules qui adhèrent étroitement entre elles dessine un sillon qui est l'amorce de la lèvre blastoporale ; elles entraînent les cellules voisines du mésoderme et de l'endoderme. La gastrulation qui suit implique des mouvements morphogénétiques complexes : **épibolie**, avec une extension de l'ectoderme dont les cellules qui se divisent s'aplatissent et s'orientent tangentielle à la surface, **involution** autour de la lèvre blastoporale et **migration** des cellules du mésoderme, guidées par des contacts et des liaisons orientées entre des protéines membranaires et un réseau de protéines de la matrice extra-cellulaire telle la fibronectine (voir § 13.4.4) qui tapisse le toit du blastocèle.

13.1.2 Pendant la neurulation

Dans l'ectoderme qui se trouve au-dessus de la voûte de l'archentéron, les cellules se multiplient sur un espace qui reste constant ; elles deviennent donc plus étroites et plus hautes dans une direction perpendiculaire au plan de la plaque neurale, cependant que les cellules du futur épiderme, s'aplatissent et s'étalent en surface tout en se multipliant et s'intercalant (voir § 8.3.3), elles seules étant destinées à recouvrir la totalité de l'embryon. Le creusement de la gouttière neurale va être déterminé par la contraction coordonnée du cytoplasme apical de certaines cellules de la plaque neurale alignées suivant l'axe antéro-postérieur de l'embryon (fig. 13.2). Ces alignements parallèles forment une charnière axiale et des charnières latérales. Elles permettent la transformation de la plaque neurale en gouttière qui, se renfermant, donnera le tube neural. Ce mouvement débute en arrière de l'encéphale puis progresse vers l'avant et vers l'arrière. Les cellules situées sur le pourtour de la plaque neurale se déforment plus que celles qui sont dans la partie centrale de la plaque (effet « cordon de bourse »).

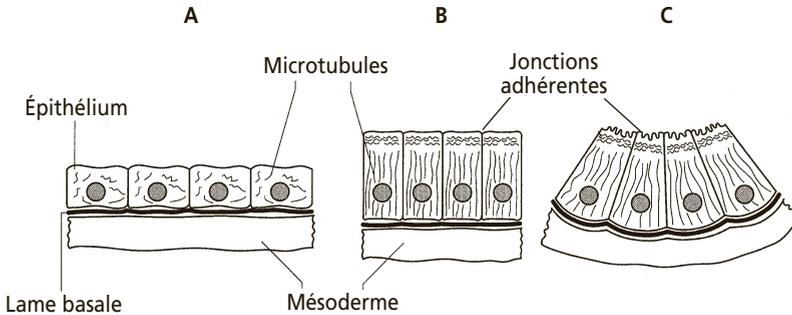


Figure 13.2 - Différenciation d'un ectoderme soit en épiderme présomptif (A) doublé de mésoderme, soit en tissu de la plaque neurale (B et C).

Dans le premier cas, l'épiderme est aplati ou cubique, les microtubules orientés en tous sens. Dans le second cas, les microtubules sont parallèles au sens de l'allongement de la cellule; les microfilaments situés au niveau des jonctions adhérentes ceinturent la cellule. Leur contraction déclenche le creusement de l'ensemble du feuillet, et l'apparition de la gouttière neurale.

13.1.3 Mécanismes intra-cellulaires qui déterminent les changements de forme

Lorsque les cellules du blastopore ou de la plaque neurale s'allongent, des constituants du cytosquelette cytoplasmique, les **microtubules**, formés par l'assemblage de monomères de tubuline, s'orientent dans le sens du grand axe cellulaire, s'allongent et jouent un rôle de soutien et de transporteur d'éléments cytoplasmiques dans le sens de l'allongement de la cellule. L'emploi de **colchicine** qui inhibe la polymérisation de la tubuline, empêche cet allongement ; la formation d'une plaque neurale par exemple, sera inhibée.

Les contractions cellulaires localisées qui interviennent à la gastrulation ou à la neurulation sont dues à la présence de **microfilaments d'actine**, de 50 Å de diamètre

et qui possèdent des propriétés contractiles. Dans la plaque neurale, par exemple, les microfilaments sont situés au niveau des **jonctions adhérentes** et forment des cordons circulaires localisés en position sous-membranaire dans la région apicale des cellules épithéliales. Reliées indirectement à ces microfilaments par leur domaine intracytoplasmique, des molécules adhésives transmembranaires assurent la jonction entre cellules voisines. Comme l'adhérence intercellulaire est forte, la contraction coordonnée de filaments d'actine déclenche le mouvement d'ensemble du feuillet neural qui s'incurve. Des substances telles que la **cytochalasine B**, qui désorganisent les microfilaments, empêchent leur contraction et inhibent ce type de mouvement d'invagination.

Ces deux mécanismes se retrouveront à l'origine d'un bon nombre de morphogénèses.

13.1.4 Synthèses spécifiques de protéines du cytosquelette sous l'action d'une induction

Les transformations des feuillets embryonnaires résultent de modifications coordonnées de la forme des cellules dans lesquelles des protéines spécifiques (tubuline ou protéines contractiles) ont été synthétisées. Ces synthèses, cantonnées à certains territoires embryonnaires à des moments précis, peuvent être une réponse à une **induction**, signal transmis par les cellules d'un tissu voisin (voir chap. 14). On a montré que, dans la plaque neurale, la localisation des microfilaments au pôle apical de la cellule est due à une information transmise au niveau de la lame basale de l'épithélium neuroblastique, celle-ci appartenant à la matrice extra-cellulaire, en contact avec le mésoderme dorsal. Une dissociation d'avec la lame basale modifie en effet la position des microfilaments dans les cellules d'une plaque neurale isolée en culture *in vitro*, ainsi que le sens d'enroulement de cette plaque en un tube neural, qui peut se trouver inversé. La réassociation de l'épithélium et de la lame basale, après un retournement de 180°, renverse la polarité des cellules et le site de formation des microfilaments.

La raison de la localisation du premier mouvement morphogénétique au seul territoire cordo-mésodermique, lors de la gastrulation, réside probablement dans une caractéristique propre au cytoplasme des cellules de l'endoderme marginal dorsal dont les potentialités se sont précisées à la fin de la segmentation (voir chap. 12).

13.2 COHÉSION CELLULAIRE ET MOLÉCULES D'ADHÉRENCE

13.2.1 Reconnaissance et adhérence sélective des cellules au cours de l'embryogenèse

Dès la première division de segmentation, des molécules d'adhérence assurent la cohésion des blastomères, ce qui est indispensable pour qu'un organisme multicellulaire puisse se former. Les mouvements morphogénétiques seraient impossibles si toutes les cellules présentaient les mêmes affinités entre elles. Il apparaît une **adhésivité sélective** entre les cellules d'un même feuillet embryonnaire.

Des modifications de l'adhésivité sont une des conditions de la mobilité des cellules et des feuillettes. C'est par exemple ce qu'on observe au début de la gastrulation au niveau des cellules en bouteille du blastopore et au moment de la neurulation, lors de la fermeture du tube neural qui se sépare de l'épiderme, lors de l'individualisation des cellules des crêtes neurales, etc. Des modifications profondes affectant les jonctions d'ancrage et les jonctions de type « gap » au niveau des contacts intercellulaires, sont étroitement associées à ces changements de comportement cellulaire.

a) Chez les Amphibiens

L'école de Holtfreter (1939 et suiv.) a démontré qu'une adhésivité sélective existe entre les cellules d'un même feuillet embryonnaire et que cette adhésivité évoluait avec le stade de développement. Des embryons sont dissociés par digestion de la matrice à la trypsine. Les cellules sont ensuite mises en culture *in vitro* où elles se réassocient. Les amas sont d'abord hétérogènes, puis une ségrégation s'opère progressivement entre les cellules des différents feuillettes ; elles se regroupent alors entre cellules de même origine. À partir des cellules d'une gastrula, les cellules ectodermiques se rassemblent et adoptent une position externe, les cellules endodermiques forment un amas compact central, et les éléments mésodermiques s'intercalent entre les deux, évoquant la morphologie *in vivo* (fig. 13.3). Cette réorganisation, active et spontanée, démontre une adhésivité différentielle des cellules les unes par rapport aux autres, et une reconnaissance de leurs homologues. Avec des cellules provenant d'autres stades, les réagrégats sont différents. L'affinité qu'ont entre elles les cellules originaires d'un même feuillet a aussi été montrée *in vivo* (Boucaut, 1974) : des cellules originaires d'un des trois feuillettes, ectoderme, mésoderme ou endoderme sont isolées de gastrulas ou de neurulas préalablement marquées par un traceur radioactif et injectées dans le blastocèle d'une gastrula hôte. Elles s'insèrent dans un feuillet qui correspond à leur feuillet d'origine. Cette capacité de choix ne s'observe plus quand l'organogenèse a commencé.

b) Chez les Mammifères et les Oiseaux

L'école de Moscona (1962 et suiv.) a apporté la même démonstration. Il est précisé en outre que, pour une ébauche d'organe, le taux de réagrégation entre les cellules dissociées est fonction de l'âge de l'ébauche et de son état de différenciation. Dans les suspensions cellulaires issues des différentes parties d'encéphales de souris fœtales de différents âges, les réagrégats en culture atteignent des tailles optimales à des périodes différentes pour le cerveau antérieur, le cerveau moyen et le cervelet ; elles correspondent à des différences dans la chronologie de la différenciation de ces ébauches chez le fœtus. Dans les tissus différenciés, l'aptitude des cellules dissociées à se réagréger disparaît. Il n'y a pas de réassociation entre cellules appartenant à des ébauches différentes, par exemple entre foie et cerveau.

13.2.2 Les molécules d'adhérence cellulaire

Un rôle essentiel dans l'adhérence entre les cellules, aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte, est reconnu à des constituants de la membrane cellulaire regroupés sous le nom de molécules d'adhérence cellulaire ou CAM (pour « Cell Adhe-

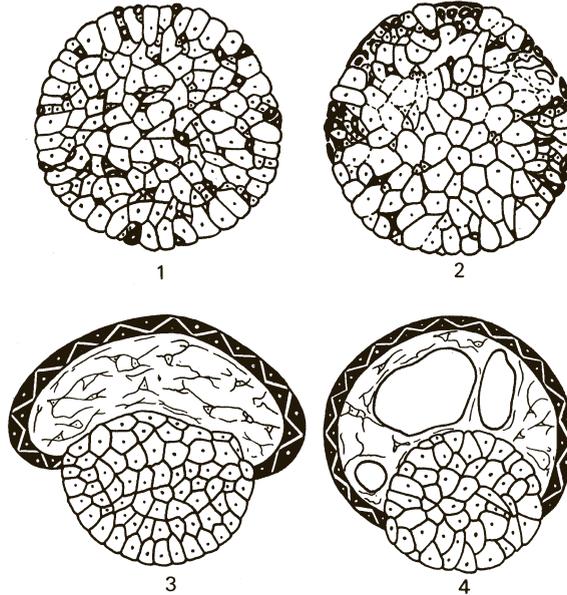


Figure 13.3 - Réassociation dans un agrégat, de l'ensemble des cellules provenant d'une gastrula d'Amphibien dissociée.

Cellules ectodermiques (en noir), mésodermiques (cellules blanches de petite taille), et endodermiques (grosses cellules blanches). D'abord réparties au hasard, on voit progressivement les cellules endodermiques se regrouper en position excentrique (1, 2), les cellules ectodermiques sont périphériques, les cellules mésodermiques en position moyenne (3, 4). (d'après Holtfreter et Townes, 1955).

sion Molécule »). Ces molécules furent initialement identifiées dans les tissus nerveux d'embryon de poulet par Edelman (1976 et suiv.) et Thiéry (1977 et suiv.) (voir encart 13.1).

Depuis ces premiers travaux, de nombreuses molécules d'adhérence ont été identifiées et après leur caractérisation, regroupées dans diverses familles distinctes. Nous n'en citerons que deux types, les superfamilles des immunoglobulines et des cadhérines.

a) Molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires dont le domaine extracellulaire N-terminal comporte un ou plusieurs domaines (motifs Ig) homologues de ceux que possèdent les anticorps, également molécules de reconnaissance des réactions immunitaires. Par leur domaine C-terminal intracytoplasmique, elles peuvent être en relation avec des éléments du cytosquelette.

Des adhérences intercellulaires peuvent s'établir par ce type de molécule, par suite d'une reconnaissance et d'une liaison s'effectuant au niveau de leur domaine extra-cellulaire.

 ENCART 13.1 Mise en évidence des CAM

Les travaux de Edelman et Thiéry ont permis de montrer que des cellules de neurorétine ou de cerveau provenant d'embryons de même âge étaient capables après leur dissociation et leur mise en culture, d'adhérer entre elles selon leur origine respective. De plus, en co-culture, une adhérence entre cellules du cerveau et cellules de la neurorétine était observée. Cette propriété ne se manifestait que pendant une brève période du développement embryonnaire et disparaissait rapidement, au-delà de 10 jours d'incubation chez l'embryon de poulet. L'injection à des lapins de suspensions de membranes isolées à partir de tissus embryonnaires permet d'obtenir de multiples anticorps dirigés contre des protéines membranaires des cellules nerveuses. Après purifications successives, il fut possible d'isoler et de caractériser l'une d'entre elles responsable de l'adhérence intercellulaire observée précédemment, la N-CAM. L'ajout d'anticorps anti-N-CAM à des cellules nerveuses embryonnaires en culture empêchait la reconnaissance et l'adhérence de ces dernières.

La liaison est généralement de type homophile, c'est-à-dire qu'elle implique deux molécules identiques portées par des cellules différentes. Elle s'établit de manière indépendante de la teneur en Ca^{++} du milieu.

La N-CAM¹ appartient à ce type de molécule (fig. 13.4). Plusieurs isoformes ont été décrites résultant de l'épissage alternatif du transcrit issu du gène codant pour cette protéine. Par ailleurs, des formes adulte et embryonnaire ont été caractérisées, elles sont dues à des modifications post-traductionnelles. La forme embryonnaire possède trois fois plus d'acide sialique que la forme adulte, ce qui lui confère des charges négatives répulsives qui affaiblissent les liaisons pouvant s'établir entre ces molécules (fig. 13.4). L'adhérence causée par ces formes embryonnaires de N-CAM est plus labile que celle qu'on observe chez l'adulte, ce qui entraîne au niveau du tissu nerveux embryonnaire, une plasticité plus importante en relation avec les processus morphogénétiques affectant ce tissu.

Outre la N-CAM, d'autres membres de cette superfamille ont été identifiés telle la Ng-CAM dans la névroglie, la contactine, etc.

b) Molécules appartenant à la superfamille des cadhérines

Les cadhérines sont assez variées. Elles ont entre elles de grandes homologies dans la séquence de leurs acides aminés, ce qui montre que les gènes qui codent pour ces protéines ont évolué à partir d'un gène ancestral commun.

Contrairement aux molécules de la famille des immunoglobulines, les forces de liaison entre deux cadhérines dépendent du taux de Ca^{++} présent dans le milieu extracellulaire, pour lequel elles possèdent plusieurs sites de liaison. C'est ce qui explique

1. Certaines dénominations datant des premières mises en évidence de molécules d'adhérence intercellulaire à partir de tissus spécifiques peuvent prêter à confusion. Ainsi la L-CAM décrite à partir du foie (L pour « liver »), n'est pas une molécule appartenant à la superfamille des immunoglobulines comme la N-CAM mais correspond à un membre de la famille des cadhérines, la E-cadhérine.

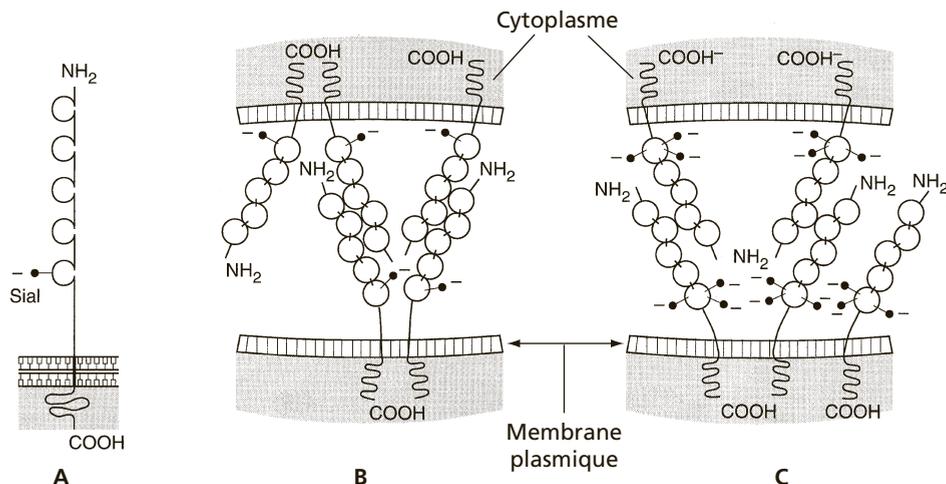


Figure 13.4 - Les N-CAM, molécules d'adhérence cellulaire.

A : Schéma d'une N-CAM insérée dans la membrane plasmique. Elle possède 5 domaines, représentés par des boucles, caractéristiques des immunoglobulines. Sur l'un d'eux est représenté un acide sialique (Sial), chargé négativement.

B : Liaison entre des molécules de N-CAM de type adulte, insérées dans les membranes de deux cellules voisines. La liaison est de type homophile (elle s'effectue entre des séquences identiques, orientées en sens opposé et complémentaires entre elles). La teneur en acide sialique est faible, la répulsion exercée par les charges négatives est peu importante, la densité en N-CAM est élevée et les liaisons sont fortes.

C : Liaison de type embryonnaire entre molécules trois fois plus riches en molécules d'acide sialique chargées négativement, qui se repoussent et affaiblissent la force des liaisons.

qu'un milieu sans calcium est généralement nécessaire pour effectuer une dissociation cellulaire de tissus (déstabilisation des structures desmosomales) ou pour empêcher une réagrégation cellulaire à partir d'une suspension de cellules isolées.

Le rôle des cadhérines dans les liaisons intercellulaires a été démontré de nombreuses façons. Ainsi, des cellules de type fibroblastique, cultivées *in vitro*, n'adhèrent pas entre elles ; après transfection d'un ADNc codant pour une cadhérine, ces cellules synthétisent la molécule qu'on trouve localisée au niveau de leurs membranes ; dès lors, elles sont capables d'adhérer entre elles. Cette liaison est rompue en ajoutant à la culture un anticorps dirigé spécifiquement contre la molécule d'adhérence. Les cellules qui deviennent ainsi adhésives établissent entre elles, des jonctions communicantes. Si on transfecte ces fibroblastes avec les gènes de deux cadhérines différentes, chacune d'elles contribue indépendamment à établir les liaisons intercellulaires. C'est ainsi que, dans un organisme, la liaison entre deux cellules est le plus souvent assurée par plusieurs types de molécules d'adhérence.

Par ailleurs, divers travaux ont montré que des cadhérines de type classique (voir encart 13.2), outre leur rôle dans des processus de reconnaissance et d'adhérence intercellulaires pouvaient intervenir dans **des mécanismes de signalisation cellulaire**.



ENCART 13.2 Diversité de la famille des cadhérines

La famille multigénique des cadhérines s'est enrichie régulièrement de nouveaux membres, depuis les premières caractérisations de ce type de molécule (Takeichi et coll., 1988), et compte actuellement une centaine de molécules regroupées en différents types d'inégale importance :

– **Les cadhérines classiques** sont présentes dans tous les tissus de Vertébrés et constituent des molécules-clés de la morphogenèse. La plupart sont transmembranaires (fig.13.5) et contractent entre elles des liaisons majoritairement homophiliques Ca^{++} -dépendantes. Leur domaine extra-cellulaire comporte fondamentalement 5 domaines homologues d'environ 110 acides aminés chacun. Le premier domaine situé à l'extrémité N-terminal des molécules de type I (ex : **E et N cadhérines**), comporte une séquence HAV (His-Ala-Val) impliquée dans la reconnaissance et la liaison spécifique homophile entre molécules de même type. Les molécules de type II telle la **VE cadhérine** sont dépourvues de cette séquence. Leur domaine cytoplasmique C-terminal est bien conservé et rattaché à des éléments microfilamentaires d'actine par l'intermédiaire d'un complexe de liaison comportant la vinculine, l' α -actinine, les caténines. Ce type de cadhérines est impliqué dans :

- la ségrégation et l'individualisation de populations cellulaires. Ainsi, des cellules ES E cadhérine –/– ne peuvent pas développer un embryon normal et forment un tératome,
- la coordination de mouvements cellulaires (convergence, extension, intercalation),
- les changements d'état d'organisation tissulaire (transition épithélio-mésenchymateuse),
- l'orientation des divisions cellulaires,
- la mise en place et le fonctionnement du système nerveux (expression différentielle de cadhérines lors de la progression du cône de croissance neuronal ou du guidage axonal ; formation des synapses et régulation de leur plasticité).

– **Les cadhérines desmosomales** (Desmocollines et desmoglécines) sont proches du type précédent. Leurs domaines cytoplasmiques sont rattachés à des filaments intermédiaires par le biais de molécules de liaison (plakophiline, plakoglobine et desmoplakine).

– **Les protocadhérines** regroupent une soixantaine de molécules, présentant un nombre variable de domaines extra-cellulaires (6 à 7) et ayant des capacités adhésives faibles. Elles interviennent de manière majeure dans l'activation de signaux en réponse à des phénomènes de reconnaissance cellulaire. Leur rôle a été mis en évidence lors de processus d'individualisation de territoires embryonnaires (ségrégation de l'ectoderme et du mésoderme lors de la gastrulation ou entre les cellules mésodermiques axiales et para-axiales) ainsi que durant l'embryogenèse nerveuse avec leur enrichissement progressif au niveau des synapses.

– **Les cadhérines atypiques** telles Flamingo (Fmi), Daschous (Ds) et Fat, possèdent des caractéristiques structurales étranges (nombre important de domaines extracellulaires tel Fat avec 34 domaines, ou à 7 domaines transmembranaires comme Fmi) et forment une dernière catégorie de molécules n'intervenant pas dans l'adhérence cellulaire, mais jouant un rôle dans le maintien de la polarité tissulaire, la régulation de la taille d'un tissu en exerçant un contrôle de la prolifération cellulaire et la coordination des mouvements morphogénétiques.

Ainsi la N-cadhérine est capable, en se liant de manière hétérophilique par son 4^{ème} domaine extracellulaire avec le récepteur au FGF (FGFR), d'activer la voie de signalisation associée à ce récepteur (Williams et coll., 2001).

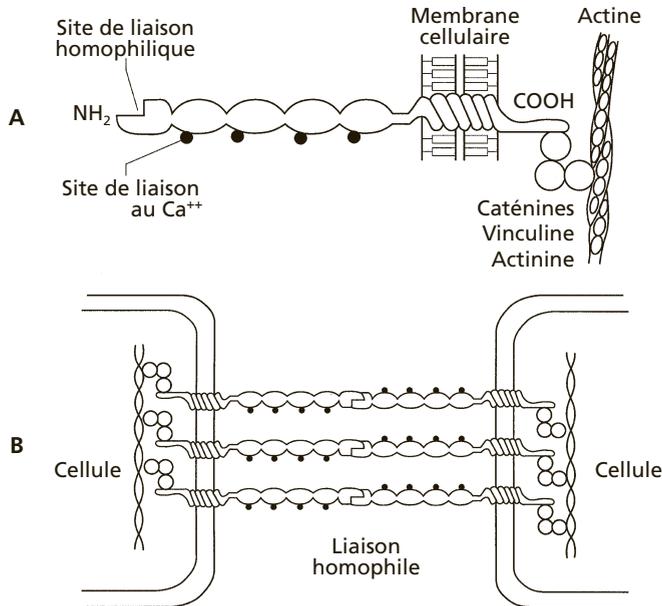


Figure 13.5 - Les cadhérines, molécules d'adhérence cellulaire.

A : Schéma de l'insertion d'une cadhérine dans la membrane cellulaire et de sa liaison à l'actine du cytosquelette.

B : Liaison de type homophile entre deux molécules de cadhérines identiques. La spécificité des liaisons est due à des séquences complémentaires terminales d'une centaine d'acides aminés. Ces molécules possèdent plusieurs sites de liaison au Ca⁺⁺ (d'après Takeichi, 1991).

13.2.3 Rôle des molécules d'adhérence dans une morphogénèse

Une cellule exprime généralement plusieurs molécules de liaison appartenant à ces deux familles ; elle possède donc à la fois des liaisons dépendantes et indépendantes du Ca⁺⁺.

Les expériences montrant le rôle des molécules d'adhérence dans une morphogénèse ou dans une anomalie de la morphogénèse sont maintenant nombreuses.

– Dès la première division de l'œuf, des **E-cadhérines** (E pour épithélium), désignées initialement sous les termes de L-CAM chez le poulet et d'uvomoruline chez la souris, assurent l'adhérence entre les blastomères, et sont la traduction d'ARN maternels synthétisés dans l'ovocyte ; la traduction avait d'ailleurs commencé pendant l'ovogénèse. Chez la souris, au stade 4 blastomères, les E-cadhérines se distribuent uniformément à la surface cellulaire et lors de la « compaction » du germe, au stade 8

Partie 3 • Mécanismes de la morphogénèse

cellules (voir § 10.2.1), les E-cadhérines viennent se localiser uniquement au niveau des zones de contact entre les blastomères.

– Lors de la nidation du blastocyste, chez les Mammifères, la liaison entre les cellules du trophoctoderme et celles de la muqueuse utérine correspond à l'apparition simultanée chez l'embryon et la mère d'une **P-cadhérine** (P pour placenta).

– Plus tardivement, à la fin de la gastrulation, une **N-cadhérine** (N pour nerveux, molécule à ne pas confondre avec la N-CAM) et une N-CAM apparaissent dans l'ectoderme dorsal tandis que la E-cadhérine en disparaît. En l'absence de molécules d'adhérence communes, cette partie de l'ectoderme pourra alors se séparer de l'épiderme et donner le tube neural et la vésicule cérébrale.

– La métamérisation du mésoderme somitique est le résultat d'un découpage du mésoderme dorso-latéral (voir § 15.6). Une modulation des adhérences cellulaires est nécessaire pour aboutir à cette succession de massifs distincts à partir d'un feuillet continu. Cette métamérisation est perturbée chez l'embryon de poulet en présence d'anticorps dirigés contre la N-cadhérine.

– L'adhérence entre feuillets ou ébauches différents implique la présence des mêmes molécules d'adhérence à la surface des cellules en contact. C'est le cas de l'ectoderme du stomodeum et de l'endoderme pharyngien qui s'accolent au moment de l'ouverture de la cavité buccale et possèdent tous deux une E-cadhérine. C'est aussi le cas au moment de la formation des reins, lorsque les canaux collecteurs formés à partir du bourgeon urétéral induisent dans le mésenchyme néphrétique des condensations cellulaires à l'origine des néphrons qui prolongeront ces canaux.

– Certaines maladies altérant la morphogénèse du système nerveux sont dues à des altérations du programme de synthèse des CAM, ou de leur répartition. Chez le mutant *staggerer* de souris, qui présente de graves défauts d'organisation des neurones du cervelet et une grave ataxie locomotrice, la maladie est due à un retard dans le passage de la forme embryonnaire à la forme adulte de la N-CAM, à la surface des cellules de Purkinje.

Dans une cellule participant à une morphogénèse, il existe donc un programme bien défini de synthèses et de « turn-over » des molécules d'adhérence en fonction de ses contacts ou de ses déplacements. En schématisant, la morphogénèse est souvent une succession de passages entre des états d'organisation cellulaire de type épithélial et des états mésenchymateux. L'épithélium constitué de cellules jointives est stable. Les mécanismes d'adhérence cellulaire y jouent par la présence d'une ou plusieurs CAM. Un mésenchyme possède une matrice extra-cellulaire abondante dans laquelle les cellules peuvent migrer. Ce processus de migration résulte de l'expression d'intégrines membranaires qui se lient à des constituants matriciels. Le passage d'un état à l'autre peut s'effectuer dans les deux sens, suivant que des molécules d'adhérence seront ou non présentes à la surface des cellules. Les **cellules des crêtes neurales** en fournissent un modèle intéressant, aussi bien pour l'étude des migrations cellulaires que pour celle de l'adhérence. Ces cellules subissent un phénomène de **transition épithélio-mésenchymateuse** qui les fait passer d'un statut de cellules épithéliales, quand elles sont dans l'aire latérale de la plaque neurale à celui de cellules mésenchymateuses, quand dissociées, elles migrent avant

de reconstituer des éléments compacts, comme les ganglions nerveux. La N-cadhérine, la N-CAM et la E-cadhérine sont exprimées dans les crêtes neurales, elles disparaissent pendant la migration, tandis qu'apparaissent des intégrines, récepteurs membranaires à la fibronectine (voir plus loin). La N-cadhérine et la N-CAM réapparaissent pendant l'agrégation en rudiments de ganglions.



Il est à souligner que la majorité des carcinomes s'avère d'origine épithéliale et que la dérégulation de l'expression de la E-cadhérine joue un rôle majeur dans le processus de cancérisation. Il a été montré que l'intervention de la sérine/thréonine-kinase Akt associée à celle de l'activation du facteur de transcription Snail provoque la répression de l'expression de la E-cadhérine avec pour conséquence la transformation de cellules épithéliales en cellules possédant des caractéristiques invasives. Cette cadhérine peut être considérée comme suppresseur de tumeur, des modifications quant à son expression pouvant entraîner une transition épithélio-mésenchymateuse aux tragiques conséquences.

13.3 COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES ET COORDINATION DES MOUVEMENTS CELLULAIRES

Les adhérences intercellulaires créent des rapprochements entre cellules de sorte que se forment des **jonctions communicantes** ou « **gap junctions** » qui sont induites par ces adhérences comme l'ont montré (voir § 13.2.2b) les cultures de fibroblastes transfectés avec des ADNc de cadhérines.

Au sein d'un ensemble de cellules étroitement unies par des molécules d'adhérence, des communications s'établissent permettant une certaine coordination des fonctions, notamment des mouvements cellulaires. C'est une propriété des jonctions communicantes.

13.3.1 Description et fonctions des jonctions communicantes

Ce sont des plages comprenant des milliers de perforations transmembranaires, ou *nexus* qui se différencient simultanément dans les membranes de deux cellules adjacentes, aux endroits où les distances intercellulaires ne sont que de l'ordre de 20 nm.

Chaque perforation (**connexon**), est un tunnel bordé de 6 molécules de protéines transmembranaires (les **connexines**) qui est face à un connexon de cellule voisine. Des anticorps dirigés contre ces protéines ont été obtenus. On peut évaluer la densité en jonctions sur coupes histologiques en incubant celles-ci en présence d'anticorps couplés avec une molécule fluorescente. L'injection d'anticorps *in vivo* peut également bloquer leur fonctionnement.

Les jonctions communicantes ne sont pas des perforations passives. Il existe une douzaine de connexines différentes regroupées dans 2 sous-familles dont chacune aurait des fonctions propres (qui pourraient d'ailleurs se recouvrir partiellement), dans les processus de développement. Leur présence et leur nature pourraient être contrôlées par des molécules qui assurent l'adhérence intercellulaire, comme la E-cadhérine.

Les jonctions communicantes sont des zones de passage de cellule en cellule d'ions et de molécules atteignant 1 000 daltons, notamment des nucléotides comme l'AMPc et le GMPc, des vitamines, l'acide rétinoïque, des hormones stéroïdes. Le passage de ces ions ou molécules dont certaines constituent des seconds messagers permet le **couplage métabolique** entre cellules voisines. Il n'y a aucune résistance électrique transmembranaire entre les cellules reliées.

13.3.2 Les jonctions communicantes au cours du développement

Chez les Amphibiens, ces jonctions existent dès la morula entre les cellules en division synchrone. Elles sont plus nombreuses dans la gastrula. Alors que les cellules de la blastula sont souvent sphériques avec des aires de contact sur un faible pourcentage de leur surface, la gastrula a des cellules polygonales avec de larges surfaces de contact entre elles. Cette adhésivité n'apparaît pas chez des embryons provenant de croisements entre partenaires d'espèces trop éloignées et qui ne se développent que jusqu'à la gastrulation exclue. Parallèlement, les cellules en culture du mésoderme présomptif de ces hybrides ne présentent pas d'adhésivité entre elles.

Avant la neurulation, on a pu constater une déconnexion entre le territoire de la plaque neurale et celui de l'épiderme. Il se manifeste par une augmentation de la résistance électrique entre ces ébauches du fait que les ions ne passent plus, les jonctions communicantes ayant disparu. Quand la neurulation est achevée, les jonctions se rétablissent au sein de l'épiderme dorsal qui s'est ressoudé. Plus tard, lors du découpage du mésoderme en somites et de la partition des somites en dermatome, sclérotome et myotome, des modifications dans la répartition des jonctions communicantes précèdent ces changements.

On constate donc, de façon générale que cette voie de communication de cellule à cellule existe au sein d'une même ébauche et disparaît dès que deux groupes de cellules embryonnaires s'engagent dans des voies de différenciation divergentes.

Outre un rôle dans les coordinations cellulaires, ces jonctions interviennent aussi dans les échanges entre tissu inducteur et tissu induit (voir chap. 15).

13.4 MIGRATIONS CELLULAIRES ET MATRICE EXTRA-CELLULAIRE

Dès le début du développement, les cellules sécrètent des macromolécules qui s'organisent en une matrice extra-cellulaire. Elles forment un réseau comprenant notamment des **collagènes**, des **protéoglycannes** et des molécules telles que la **fibronectine**, la **tenascine**, la **laminine** et l'**entactine**. Les cellules adhèrent à certaines de ces macromolécules essentiellement par un même type de récepteurs : les **intégrines**. Cette matrice joue un rôle de soutien, elle établit une continuité entre les cellules des différents feuillettes, mais elle peut aussi avoir une fonction de compartimentation, empêchant des interactions entre cellules voisines. Elle constitue aussi le milieu au sein duquel migrent les cellules.

Les relations des cellules avec la matrice extra-cellulaire sont en continuel remaniement sous l'action d'enzymes, comme les **glycosyl-transférases** et les **métalloprotéases**.

13.4.1 Les composants de la matrice extra-cellulaire essentiels pour la migration cellulaire

a) La fibronectine (fig. 13.6A)

Il existe une douzaine d'isoformes très voisines de fibronectine. Ce sont des glycoprotéines formées de deux sous-unités de 220 à 240 kDa reliées par des ponts disulfures. Chaque sous-unité présente une séquence peptidique RGD (Arg-Gly-Asp) de liaison avec une intégrine. Certaines cellules possèdent en outre d'autres récepteurs

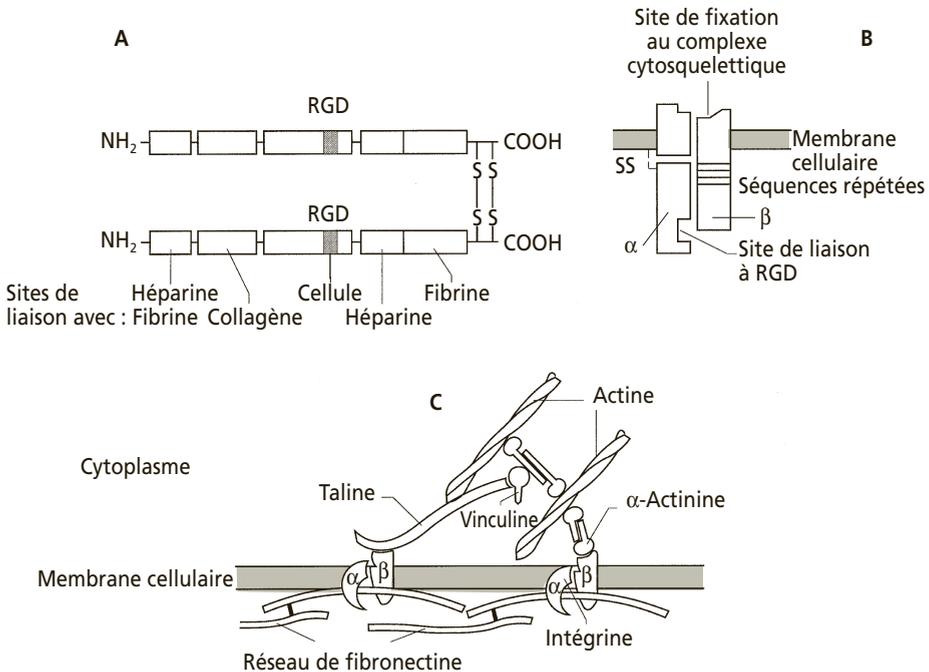


Figure 13.6 - Fibronectine, intégrine et liaison cellule-matrice extra-cellulaire.

A : Schéma de la molécule de fibronectine, dimère aux sous-unités reliées par des ponts disulfures. Elle présente des sites de liaison avec des molécules de la matrice extra-cellulaire, et un site spécifique de la liaison à une intégrine : la séquence RGD.

B : Schéma d'une molécule d'intégrine ; molécule transmembranaire, hétérodimère, avec deux sites, l'un externe reconnaissant la séquence RGD portée par des molécules de la matrice, l'autre interne, permettant un rattachement au cytosquelette par l'intermédiaire de molécules de liaison.

C : Représentation schématique du mode de liaison de la cellule au réseau de fibronectine extra-cellulaire (d'après Luna et Hitt, 1992).

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

membranaires capables de se coupler à des sites de liaison autres qu'à la séquence RGD portée par la molécule de fibronectine ; ces liaisons d'une autre nature renforcent ou modulent l'adhérence cellule-matrice.

Les molécules de fibronectine possèdent aussi différents domaines assurant la liaison avec d'autres composants de la matrice extra-cellulaire, comme le collagène ou les héparanes. Elles constituent donc des intermédiaires entre la trame matricielle et les cellules mobilisables.

b) La tenascine

C'est une molécule constituée par 6 sous-unités associées en étoile et qui est abondante dans la matrice extra-cellulaire embryonnaire. L'affinité des cellules pour ce substrat est variable suivant les types cellulaires : certaines cellules y adhèrent tandis que d'autres s'en détachent. Suivant la composition de la matrice en tenascine et en fibronectine, les capacités d'adhérence et de migration des cellules embryonnaires peuvent se trouver modifiées.

c) La laminine

C'est une molécule composée de 3 chaînes polypeptidiques qui possède des sites de liaison avec d'autres molécules de la matrice, telles que des héparanes et des collagènes, et avec des intégrines membranaires de certaines cellules, essentiellement des cellules épithéliales et des neurones. C'est un constituant essentiel des lames basales où elle forme un réseau en relation, par l'intermédiaire d'autres molécules de la matrice comme l'entactine (ou nidogène), avec un réseau lamellaire de collagène IV. On la trouve dans la matrice qui tapisse le toit du blastocèle. Les liaisons cellulaires à la laminine sont fortes ; cette molécule contribue à assurer la cohésion des épithéliums pendant les migrations lors de la morphogenèse et, dans l'organe en place, intervient dans l'acquisition de la polarité cellulaire des épithéliums.

13.4.2 Les intégrines, récepteurs membranaires essentiels dans la relation des cellules avec la matrice extra-cellulaire

a) Les intégrines (fig. 13.6B)

Les intégrines sont des récepteurs membranaires qui interagissent avec de nombreuses macromolécules de la matrice extra-cellulaire par exemple la fibronectine, la tenascine, la laminine, notamment lors des processus migratoires. Ce sont des hétérodimères constitués de deux chaînes polypeptidiques, les sous-unités α (16 types) et β (9 types) : leur combinaison a permis d'identifier, actuellement, plus de 20 récepteurs différents. Du côté cytoplasmique, l'intégrine se lie aux microfilaments d'actine par l'intermédiaire de la sous-unité β et d'un complexe d'une dizaine de protéines de liaison (taline, vinculine, α -actinine, etc.) (fig. 13.6C). La liaison entre une intégrine et son ligand peut être à l'origine de signaux conduisant à un remodelage du cytosquelette. C'est cette fonction d'« intégration » entre deux charpentes, l'une extra-cellulaire (éléments structuraux matriciels), l'autre intra-cellulaire (cytosquelette) qui justifie le terme d'intégrine.

Les hétérodimères $\alpha\beta$ reconnaissent une séquence peptidique de trois acides aminés (RGD) présente dans des protéines variées de la matrice, et s'y lient. Certaines intégrines ne reconnaissent qu'une seule protéine matricielle, d'autres ont des événements de liaison plus larges. D'autre part, les protéines de la matrice peuvent posséder des sites de reconnaissance pour des intégrines différentes. L'affinité des liaisons contractées entre les intégrines et leurs ligands est susceptible d'être modulée par de nombreux facteurs du micro-environnement cellulaire (cations divalents, pH...).

Les intégrines sont aussi une voie par laquelle des molécules de la matrice extracellulaire peuvent induire l'expression de gènes spécifiques au cours de la différenciation d'organes, ce qui a été montré par exemple pour le foie, les testicules, les glandes mammaires. Ces dernières, cultivées sur support de plastique seul, prolifèrent sans se différencier et les gènes de *c-myc* et de la cycline D1 qui s'y expriment, sont actifs dans les cellules en multiplication. Par contre, dans une culture réalisée en présence de constituants de la lame basale (ex : laminine), ces gènes sont inactivés et ceux qui sont propres à la différenciation de glande mammaire, comme les gènes de la β -caséine et la lactoferrine sont activés et des structures d'épithéliums glandulaires et d'acini se différencient. Les liaisons des intégrines exprimées par les cellules épithéliales avec des constituants matriciels de la lame basale permettent non seulement une différenciation de type épithélial mais encore la survie cellulaire (voir § 14.2.1C).

b) Les plaques focales d'adhérence et la stabilisation cellulaire

L'adhérence des cellules à un substrat *in vitro* s'accompagne de la mise en place de liaisons étroites entre des éléments du substrat et des constituants membranaires. Il se constitue alors des structures au niveau membranaire appelées **plaques focales d'adhérence** au sein desquelles s'agrègent les **intégrines** impliquées dans les liaisons cellules-substrat.

C'est par des liaisons similaires, où interviennent de nombreuses molécules, que lors des migrations cellulaires, des **points d'ancrage transitoires** se constituent, mettant en relation indirecte, composants matriciels et éléments cytosquelettiques.

Les intégrines n'ont pas qu'une fonction purement mécanique de liaison à la matrice. Leur activation induit aussi le recrutement de molécules de signalisation intra-cellulaire. On compte ainsi plus de vingt protéines différentes dans les plaques d'adhérence, et notamment des **tyrosine-kinases** impliquées dans le fonctionnement de diverses voies de transmission des signaux. En particulier, l'agrégation des récepteurs tyrosine-kinase au niveau des sites d'adhérence optimiserait la phosphorylation de protéines cibles contrôlant le comportement cellulaire (morphologie, différenciation, prolifération...).

c) Les migrations cellulaires

Lorsqu'une cellule migre sur un tapis de molécules de fibronectine, elle établit des liaisons entre ces molécules et des intégrines. Les liaisons entre intégrine et fibronectine par exemple, sont peu denses, très labiles et se forment en un point d'un filo-

pode pour se défaire en un autre (fig. 13.7). L'efficacité de la liaison des cellules avec les substrats de la matrice extra-cellulaire est variable suivant les types d'intégrines présents à la surface cellulaire pour lesquels les protéines de la matrice présentent des affinités variables.

Une utilisation modulée de ces sites de reconnaissance cellulaires et matriciels est à la base de phénomènes migratoires complexes, dont on étudiera deux exemples avec la migration des feuilletts pendant la gastrulation et la migration des cellules des crêtes neurales.

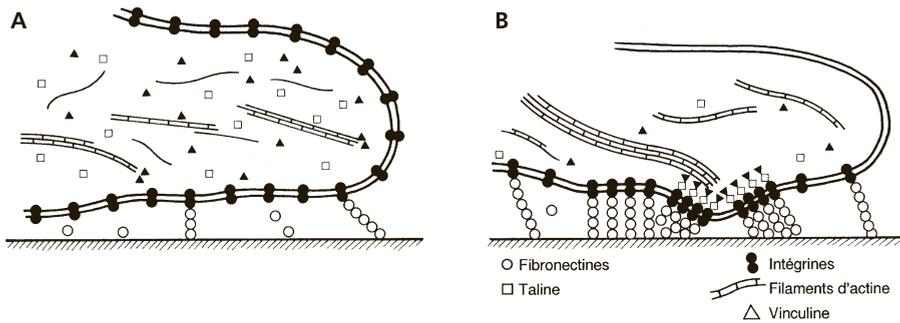


Figure 13.7 - Interprétation théorique des rapports cellule-substrat en phase migratoire et en phase stationnaire.

A : Phase migratoire : les molécules de fibronectine sont espacées, les prolongements cellulaires avec leurs récepteurs les utilisent comme des prises lors d'une ascension.
B : Phase stationnaire : une condensation des récepteurs membranaires crée des points d'ancrage solides et stables. Le cytosquelette passe d'une organisation diffuse à la constitution de faisceaux d'actine sous forme de fibres de tension (d'après Thiery et coll., 1987).

13.4.3 Des enzymes remanient constamment les relations entre la matrice et les cellules

a) Les glycosyl-transférases

Les chaînes de glycoprotéines membranaires constituent à la surface des cellules un feutrage épais : le **glycocalyx**. Elles peuvent établir des liaisons avec les chaînes de polysaccharides des molécules de la matrice. Les séquences des sucres d'un polysaccharide sont très spécifiques, et elles sont déterminées par les actions successives d'enzymes : les **glycosyl-transférases**. Ces enzymes membranaires golgiennes catalysent spécifiquement la liaison d'un nouveau sucre à une chaîne préexistante lors de la glycosylation et peuvent donc modifier les affinités et la liaison cellule-matrice. L'apparition ou la destruction de ces liaisons peut modifier la mobilité cellulaire. La présence de tel type de glycosyl-transférase est le résultat final d'une synthèse protéique (celle de l'enzyme) traduisant une information génétique. Les changements d'activité génique peuvent se traduire rapidement en modifications de l'équipement enzymatique grâce au « turn-over » membranaire. C'est ainsi que,

pendant l'embryogenèse de la souris et pendant la différenciation *in vitro* de lignées cellulaires, on montre que certaines molécules de haut poids moléculaire sont présentes exclusivement aux stades indifférenciés.

b) Les métalloprotéases

Les mouvements cellulaires impliquent des ruptures de certaines liaisons entre les protéines d'adhérence et la formation de liaisons nouvelles. D'autre part, certains mouvements cellulaires nécessitent des destructions importantes de la matrice extracellulaire : implantation de l'embryon au sein de la muqueuse utérine, développement d'organes ramifiés comme le pancréas, les poumons, etc. au cours desquels les membranes basales sont rompues et le conjonctif sous-jacent partiellement attaqué. L'ensemble des enzymes activées dans ces destructions et sécrétées par les cellules migratrices, est appelé globalement **métalloprotéases de dégradation des matrices (MMPs)** (Matrisian, 1992) ; elles dégradent de manière plus ou moins spécifique les collagènes, la fibronectine, la laminine, les protéoglycannes. Leur activité est régulée par des inhibiteurs (**TIMPs**) sécrétés par ces mêmes cellules en fonction de l'amplitude de leurs migrations.

13.4.4 Un réseau de fibronectine guide la migration des feuilletts pendant la gastrulation (fig. 13.8)

La présence de fibronectine sur le toit du blastocèle, dans la gastrula âgée d'un Amphibien a été révélée par immunocytochimie à l'aide d'anticorps fluorescents (Boucaut et coll., 1984). La fibronectine est sécrétée par les cellules de l'hémisphère animal qui délimitent le blastocèle, au stade de la blastula et au début de la gastrulation. Il n'y a pas de matrice extra-cellulaire dans l'hémisphère végétatif. Le réseau de fibronectine peut être reconnu en microscopie à balayage, grâce à son marquage avec un anticorps anti-fibronectine lui-même rendu visible au microscope électronique par une liaison avec de l'or colloïdal. On y voit les cellules du mésoderme qui migrent en émettant des filopodes ; ceux-ci s'attachent aux mailles du réseau qui sont orientées suivant une direction définie et qui déterminent ainsi le sens des déplacements des cellules.

Si une partie du toit du blastocèle est découpée et retournée de telle façon que la face externe sans fibronectine soit orientée vers l'intérieur, les cellules migrantes du mésoderme contourneront cette surface au cours de la gastrulation.

Si on empêche l'interaction entre fibronectine et intégrines membranaires situées sur la membrane cellulaire, la migration sera inhibée. Un des moyens d'y parvenir est d'injecter dans le blastocèle un anticorps monoclonal anti-fibronectine qui réagit avec le domaine de liaison de la fibronectine à la cellule. Dans ce cas, la gastrulation ne peut avoir lieu. Les tissus ectodermique et mésodermique subissent une élongation mais se plissent sur place. Le mésoderme ne pouvant entrer en contact avec l'ectoderme, l'induction neurogène n'a pas lieu. Pour que les cellules puissent se déplacer sur la fibronectine, il est nécessaire qu'elles n'aient pas un trop grand nombre de récepteurs et que la concentration en fibronectine ne soit pas trop élevée, sinon le processus d'adhérence excessif empêcherait la formation des filopodes

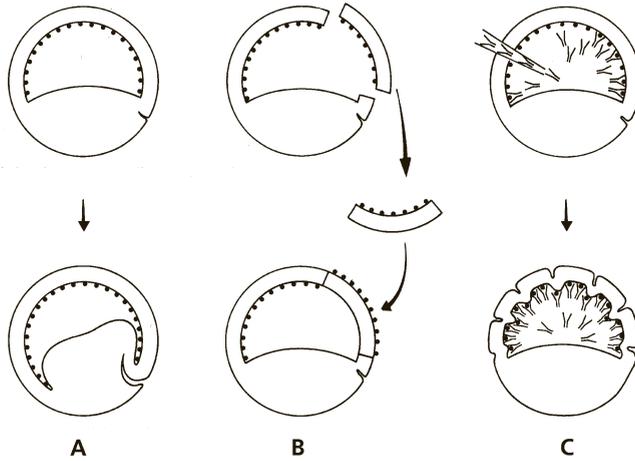


Figure 13.8 - Rôle de la fibronectine dans la migration cellulaire pendant la gastrulation d'un Amphibien.

A : Un feutrage de fibronectine existe sous le toit du blastocèle. Pendant la gastrulation, les récepteurs membranaires des cellules mésodermiques migrantes se lient aux molécules de fibronectine.

B : Lorsqu'une partie du toit du blastocèle est retournée, les cellules mésodermiques éviteront la région opérée qui est dépourvue de fibronectine. Il y aura une lacune dans le toit de l'archentéron.

C : La fibronectine peut être neutralisée par l'injection d'anticorps qui réagissent avec le domaine de liaison de la fibronectine à la cellule. La migration cellulaire n'a pas lieu en l'absence de liaison fibronectine-cellule. Le feuillet de l'hémisphère animal, où les cellules prolifèrent malgré le blocage de la gastrulation, se plisse sur place.

exploratoires et les déplacements. La cellule deviendrait stationnaire (fig. 13.7). Chez les Oiseaux et les Mammifères, les fibronectines apparaissent aussi très tôt dans le développement et jouent un rôle analogue pendant la gastrulation.

Chez les Oursins, on les trouve dans le blastocèle à la surface des cellules du mésenchyme primaire ; elles doivent intervenir dans la migration lors de la gastrulation.

13.4.5 Migration des cellules des crêtes neurales

On a pu étudier la migration des cellules des crêtes neurales grâce à des techniques de marquage cellulaire dont la plus classique est la greffe caille-poulet mise au point par N. Le Douarin. D'autres procédés l'ont complétée, avec l'emploi de traceurs fluorescents, d'anticorps, etc.

a) Pourquoi une cellule devient-elle migratrice?

Dans le cas des crêtes neurales, seules cellules neuroectodermiques à migrer, les études menées *in vivo* et *in vitro* ont montré que BMP4 suffit à programmer leur délamination et leur migration. Ce changement de comportement des cellules des crêtes neurales correspond à un cas de transition épithélio-mésenchymateuse. Les

autres cellules neurodermiques verraient l'effet de BMP4 neutralisé par des antagonistes, comme Noggin, ou Sonic hedgehog. BMP4 pourrait contrôler l'expression des gènes codant pour les molécules d'adhérence, comme la N-cadhérine, qui disparaît de la surface des cellules dès qu'elles ont entamé leur migration. Sans doute exerce-t-il aussi un contrôle dans le changement des intégrines : certaines, plus aptes à la locomotion apparaissent comme $\alpha4\beta1$, alors que $\alpha6\beta1$ disparaît.

b) Les voies de migration

- *Nature des supports de la matrice*

Les supports sur lesquels migrent les cellules des crêtes neurales sont de nature assez variée *in vitro* (fibronectine, laminine, vitronectine, collagène). Une association de ces divers éléments, variable selon les milieux, pourrait moduler les migrations. Les cellules des crêtes neurales migrent de préférence sur la laminine qui permet une migration plus rapide que les autres composants. Leur migration groupée pourrait s'expliquer par le fait que la laminine est peu dispersée dans la matrice ou que des molécules d'adhérence spécifiques existeraient entre les cellules des crêtes neurales.

- *Variabilité des intégrines*

Les voies de migration des cellules des crêtes neurales ne se constituent pas au hasard. À un stade défini du développement, elles quittent la région dorsale du tube neural et suivent des voies où la matrice extra-cellulaire composée de collagènes et de fibronectine est bordée par des lames basales riches en laminine.

Dans la région troncale, elles empruntent deux voies distinctes, l'une latéro-dorsale est suivie par les cellules qui se différencieront ultérieurement en mélanocytes, l'autre ventrale passe entre les somites, elle est empruntée par les cellules qui formeront notamment les structures ganglionnaires nerveuses. Dans cette dernière voie de passage, les cellules longent la face antérieure de chaque somite évitant leur face postérieure. On a en effet découvert dans les régions postérieures des somites, des molécules de la matrice comme des protéoglycannes du type chondroïtine sulfate, des molécules d'adhérence intercellulaires et des récepteurs à activité tyrosine-kinase qui empêcheraient toute migration dans cette région. On constate de même que la région de la corde est exclue des voies de migration.

Il ne semble pas qu'il y ait un déterminisme précoce des cellules des crêtes neurales du tronc ; des expériences de greffes hétérotopiques montrent qu'elles se comportent plutôt en fonction de l'endroit où elles sont greffées qu'en fonction de leur lieu d'origine. Il en va cependant autrement des cellules des crêtes neurales du cerveau postérieur.

Nous avons vu la complexité des intégrines et la possibilité pour les molécules de la matrice de réagir différemment avec une cellule suivant la nature des intégrines qui seront présentes à la surface de cette cellule. Une grande variété d'intégrines est exprimée au cours du temps par les cellules des crêtes neurales. Par exemple, parmi les récepteurs à la laminine, chez le poulet, l'intégrine $\alpha6\beta1$ disparaît de la surface des cellules pour ne réapparaître qu'au début de la différenciation des neurones sensoriels.

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

Les différentes intégrines possèdent donc des fonctions définies et coopèrent entre elles durant le déplacement de la cellule. Par ailleurs, elles répriment l'adhérence intercellulaire dépendant de la N-cadhérine, empêchant une cohésion trop importante au sein une population cellulaire en migration, ce qui gênerait leur mobilité.

La migration des cellules des crêtes neurales s'effectue donc dans un milieu matriciel très fluctuant, en utilisant une large gamme d'intégrines s'exprimant suivant des programmes complexes.

Résumé

Dès la première division d'un œuf fécondé, des molécules d'adhérence assurent la cohésion des blastomères entre eux.

Les mouvements morphogénétiques débutent, chez les Amphibiens, dans la région du centre de Nieuwkoop et du centre organisateur de Spemann et Mangold où sont synthétisées les protéines inductrices de structures axiales qui programment les mouvements de la gastrulation. La protéine régulatrice Goosecoïd, par exemple, est synthétisée dans les cellules qui migrent le plus avant sous le toit de l'archentéron (voir § 14.3.2) ; on peut penser qu'elle déclenche la transcription de l'information nécessaire aux mouvements cellulaires, notamment la synthèse des protéines du cytosquelette, des intégrines, etc.

Les mouvements d'ensemble ne sont possibles qu'avec une cohésion accrue et une coordination des cellules. Les molécules d'adhérence et les composants des lames basales assurent la cohésion. Les jonctions communicantes sont un moyen d'assurer une communication intercellulaire nécessaire à cette coordination.

Les reconnaissances et les contacts entre cellules ou entre cellules et matrice évoluent pendant la suite du développement embryonnaire. L'ensemble est programmé génétiquement par des modifications dans la composition des molécules d'adhérence, des connexines, des glycoprotéines et protéoglycannes membranaires, par le jeu contrôlé d'enzymes membranaires, etc. Chaque type d'adhérence est le résultat de l'action combinée de plusieurs molécules membranaires ainsi que du fonctionnement des jonctions communicantes.

La matrice extra-cellulaire est le substrat où migrent les cellules, dans toute morphogenèse. Une adhérence faible et rapidement renouvelée des filipodes des cellules migrantes est assurée par des intégrines membranaires qui se lient à des molécules de la matrice extra-cellulaire, telle la fibronectine présente sur de nombreux chemins migratoires.

Les mouvements des cellules ou leur immobilisation dépendent donc de l'existence, de la quantité et de la répartition des molécules d'adhérence membranaires (cadhérines, intégrines, glycosyl-transférases) et des substrats (fibronectine, laminine, etc). Leur présence est souvent le résultat de synthèses régulées par les sécrétions des cellules inductrices appartenant à d'autres feuillettes venant à leur contact ou à leur voisinage. Les inductions sont un autre aspect de ces relations intercellulaires.

Questions

- 13.1** Qu'appelle-t-on cellules en bouteille ?
- 13.2** Quelles sont les principales familles moléculaires impliquées dans les adhérences intercellulaires ?
- 13.3** Le cytosquelette peut-il jouer un rôle dans les mouvements morphogénétiques ?
- 13.4** À quel type de famille moléculaire les molécules membranaires impliquées dans les migrations cellulaires appartiennent-elles ?
- 13.5** Quelles sont les unités structurales associées à la formation des jonctions communicantes (ou « gap junctions ») ?
- 13.6** Les « gap junctions » jouent-elles un rôle au cours du développement ?
- 13.7** À quoi correspond le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse ?
- 13.8** Existe-t-il des cas de transition mésenchymato-épithéliale au cours du développement ?
- 13.9** Pour quelles raisons applique-t-on parfois le terme « effet cordon de bourse » pour désigner un phénomène entraînant un changement conformationnel d'une structure épithéliale ?
- 13.10** Quelles sont les molécules matricielles qui peuvent être à l'origine d'une déstructuration des lames basales ?

Réponses page 390

LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE OU APOPTOSE

- 14.1 Contrôle génétique et déroulement d'une mort cellulaire programmée par apoptose
- 14.2 Quelques exemples d'apoptose au cours du développement

La mort cellulaire survient de façon permanente chez tout organisme vivant, animal ou végétal dont les tissus sont le site d'un renouvellement cellulaire qui se poursuit durant toute la vie ; elle peut aussi survenir après un traumatisme nécessitant une réparation des tissus. Elle intervient également, de manière un peu paradoxale, lors de processus normaux du développement embryonnaire ; c'est cette forme de mort cellulaire qui sera étudiée ici.

Son rôle, dans ce dernier cas, n'est pas seulement d'assurer un « turn-over » cellulaire. Elle est **un moyen de construction de l'organisme**, au même titre que les migrations de feuillettes ou la croissance d'une ébauche d'organe. En effet, un développement normal n'est possible que si des organes ou des tissus qui n'ont qu'une utilité transitoire peuvent disparaître. De même, dans l'édification des organes définitifs, la croissance des ébauches s'accompagne souvent de l'élimination de matériaux excédentaires, évoquant la finition d'une sculpture.

Ces morts cellulaires ne peuvent pas être anarchiques ; **leurs modalités ainsi que leur chronologie sont programmées génétiquement**. Elles peuvent être déclenchées en temps voulu, comme pour une induction, par des facteurs qui activent des récepteurs membranaires : des facteurs de croissance (voir *infra*, BMPs) ou des hormones, comme les hormones thyroïdiennes (voir § 14.2.2).

Il existe plusieurs voies qui aboutissent à la mort cellulaire, et leurs mécanismes sont encore incomplètement connus ; nous nous limiterons à l'étude de l'**apoptose** qui est une modalité largement répandue dans le monde animal. Ce terme a été proposé en 1972 par Kerr et Wylie ; il désigne une séquence d'altérations morphologiques de la cellule précédant sa phagocytose par des macrophages : perméabilisation des membranes mitochondriales, condensation de la chromatine et fragmentation du noyau, formation de **corps apoptiques** (vésicules closes contenant du cytoplasme et des fragments nucléaires), bourgeonnement de la membrane plasmique et modification de sa composition permettant une reconnaissance par les macrophages. Ce mode de mort cellulaire programmée est à distinguer de la **nécrose cellulaire** qui survient généralement à la suite d'un traumatisme accidentel et qui se caractérise par un gonfle-

ment de la cellule suivi de l'éclatement de celle-ci, ce qui entraîne alors, par suite de la libération du contenu cytoplasmique, une réponse inflammatoire locale.

L'étude des morts cellulaires programmées a pris tout son essor avec les résultats de Horvitz et coll. (1999), qui ont montré que, au cours du développement embryonnaire d'un Nématode, *Cænorhabditis elegans*, ces morts sont programmées génétiquement et que les gènes responsables qu'ils ont identifiés ont des homologues répandus dans d'autres groupes zoologiques, notamment les Mammifères.

14.1 CONTRÔLE GÉNÉTIQUE ET DÉROULEMENT D'UNE MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE PAR APOPTOSE

Cette forme de mort cellulaire implique l'activité en cascade de cystéine-protéases particulières, les **caspases** (pour « **cysteinic aspartate-specific proteinases** ») ; l'activation des **caspases dites initiatrices** provoque l'activation en chaîne des **caspases dites effectrices** responsables de dégradations protéolytiques à l'origine de la désorganisation des structures cellulaires, ce qui aboutit à une figure d'apoptose.

14.1.1 L'apoptose est contrôlée génétiquement

Chez *Cænorhabditis elegans*, Horovitz et coll. ont montré que la mort cellulaire n'est pas une détérioration passive, mais un processus nécessitant l'intervention d'une suite de molécules spécialisées. Celles-ci ont pu être identifiées grâce à l'étude de mutations qui permettent, chez leurs porteurs, la survie de cellules qui disparaissent normalement chez la forme sauvage. Cette étude peut être suivie de façon rigoureuse car, chez cette espèce, le dénombrement cellulaire est exceptionnellement facilité. En effet, un individu hermaphrodite possède un nombre fixe et réduit de cellules somatiques (959), après que 131 cellules ont disparu par apoptose.

Quatre gènes sont impliqués dans l'apoptose : *ced-9*, *ced-4*, *ced-3* (pour « cell death abnormal ») et *egl-1* (pour « egg laying defective »). La cystéine protéase CED-3 ne peut exercer sa fonction protéolytique lorsqu'elle est liée à la protéine CED-4. Le couple CED-3/CED-4 est lui-même associé à la protéine anti-apoptotique CED-9 liée à la membrane mitochondriale, l'ensemble formant un **apoptosome**. La protéine pro-apoptotique EGL-1 en se fixant sur CED-9, provoque en cascade la libération et l'activation de CED-3, déclenchant ainsi les processus protéolytiques.

On a montré depuis la découverte de ces gènes que chez les Mammifères, certaines protéines impliquées dans l'apoptose présentaient des similitudes de séquence significatives avec les protéines de *C. elegans*. (fig. 14.1). Des homologues ont aussi été mises en évidence chez pratiquement toutes les espèces animales. On peut donc penser que les grandes lignes de la programmation de cette forme de mort cellulaire ont été conservées au cours de l'évolution. Chez les Mammifères, CED-4 et CED-3 ont respectivement pour homologues Apaf-1 (pour « Apoptotic Protease Activating Factor 1 ») et les caspases 9 et 3 ; CED-9 présente une similitude de séquence avec la protéine membranaire mitochondriale anti-apoptotique Bcl-2.

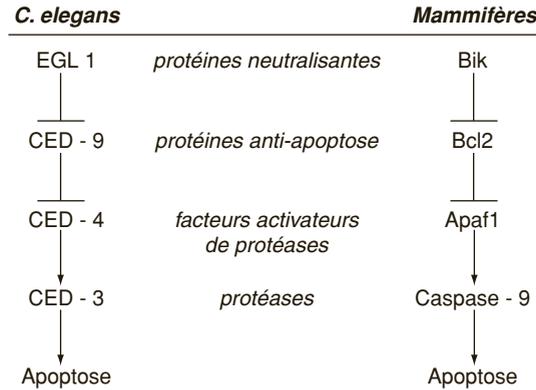


Figure 14.1 - Comparaison entre les étapes de l'apoptose chez le Nématode *Cænorhabditis elegans* et chez un Mammifère (mort neuronale).

Les gènes concernés présentent une forte homologie entre les deux modèles. L'apoptose est déclenchée par l'activation d'une protéase, (CED-3 ou Caspase-9) au sein d'un complexe (l'apoptosome) comportant les protéines CED-4 ou Apaf1. Les cellules sont protégées de la mort cellulaire par des protéines neutralisant ces facteurs (CED-9 ou Bcl-2). Si ces derniers facteurs sont neutralisés par des protéines pro-apoptose, EGL-1 ou Bik, le processus d'apoptose peut s'enclencher.

L'équilibre d'une cellule vivante sera rompu et la mort cellulaire déclenchée quand CED-9 ou ses homologues tel Bcl-2 seront à leur tour inactivés par des protéines pro-apoptose telles EGL-1 chez le Nématode, ou Bik, Bax et Bak chez les Mammifères.

14.1.2 Déclenchement de la mort cellulaire

On peut distinguer deux voies principales qui déclenchent l'activation des caspases.

L'une dite **intrinsèque** est déclenchée par des signaux apoptogènes émis à la suite de la libération de protéines par les mitochondries dans des cellules ayant subi un dommage cellulaire (traumatisme, irradiation).



Elle implique les mitochondries, le ratio entre Bcl-2/Bax conditionnant des changements de perméabilité de la membrane mitochondriale. L'inactivation des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2) par des protéines pro-apoptotiques (Bax) entraîne la libération de cytochrome c qui, en se fixant à Apaf-1, provoque l'activation en cascade des caspases.

L'autre voie dite **extrinsèque** est déclenchée par des signaux extra-cellulaires qui activent des récepteurs au niveau de la membrane plasmique, entraînant l'activation de facteurs de transcription et la synthèse de protéines nécessaires à l'activation des caspases. Les protéines BMP4 initient ainsi un certain nombre de processus d'apoptose, au niveau des crêtes neurales et des ébauches dentaires, par exemple. Les hormones thyroïdiennes contrôlent les métamorphoses d'Amphibiens (voir plus loin). Les glucocorticoïdes, l'acide rétinoïque peuvent aussi déclencher ces mécanismes. On connaît des récepteurs qui possèdent un domaine

intra-cellulaire d'environ 80 acides aminés : le **domaine de mort** (DD pour « **Death Domain** »). C'est le cas des **récepteurs TNFR-1** (pour «Tumor Necrosis Factor Receptor») et **Fas** qui, activés par la fixation de leur ligand respectif, provoquent l'activation des caspases suivant des modalités qu'on n'examinera pas ici et qui aboutissent notamment à la fragmentation chromatiniennne.

14.2 QUELQUES EXEMPLES D'APOPTOSE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

14.2.1 Disparitions et/ou remodelages de structures embryonnaires

La plupart des espèces révèlent au cours de leur développement embryonnaire le rôle joué par les processus apoptotiques dans la mise en place des structures tissulaires. Seuls quelques exemples classiques seront évoqués ici.

a) Formation des doigts

Au cours de la formation de l'extrémité des membres, chez les Tétrapodes, la séparation des doigts nécessite la dégénérescence des membranes interdigitales qui les réunissent chez le fœtus. Pour comprendre le mécanisme de cette différenciation, on a comparé l'évolution de la patte de poulet aux doigts séparés chez l'adulte et de la patte de canard qui reste palmée. Chez le poulet, après un certain stade, les tissus interdigitaux se résorbent. Cette involution ne peut être alors évitée ; elle touche les tissus *in situ*, mais aussi des tissus interdigitaux transplantés sur une autre partie du corps de l'embryon ou mis en culture. Si, en revanche, on greffe avant le stade critique les tissus interdigitaux de poulet sur un bourgeon de patte d'un embryon de canard, ils ne dégènèrent pas. En effet, n'ayant pas encore reçu au moment de la transplantation le message qui déclencherait le programme de mort cellulaire, ils ne reçoivent pas plus chez le canard qui garde sa palmature.

Chez l'embryon de poulet, le signal qui déclenche l'apoptose dans les cellules interdigitales est fourni par les protéines BMP. Les formes BMP2, BMP4 et BMP7 sont en effet présentes dans le mésenchyme interdigital. Si les récepteurs de BMP sont neutralisés expérimentalement, les membranes interdigitales ne se résorbent pas. Les BMP sont aussi présents dans les aires où se différencient les cartilages digitaux, mais leurs effets y sont neutralisés par la protéine Noggin. En effet, si *noggin* est exprimé artificiellement dans l'ensemble du bourgeon de membre, il n'y aura pas d'apoptose.

Chez le canard, les BMP sont distribués de la même manière que chez le poulet, mais leur capacité de stimuler l'apoptose interdigitale est neutralisée par une protéine transcrite par le gène *gremlin*. Une application de cette même protéine sur la zone interdigitale d'un embryon de poulet empêche également l'apoptose.

b) Système nerveux

La morphogenèse normale de l'encéphale implique une activité importante du processus de mort cellulaire programmée. L'encéphale d'une souris chez laquelle

l'apoptose a été bloquée expérimentalement en neutralisant la caspase-9 ou la caspase-3 (voir *supra*) présente une série d'anomalies liées à une prolifération des tissus qui n'est pas contrebalancée par la mort cellulaire. On observe notamment un épaississement des parois des ventricules cérébraux, ce qui entraîne l'obstruction des cavités cérébrales et une déformation du crâne liée au volume excessif de l'encéphale. Cette anomalie sera létale. De même, la délétion de *Apaf1* provoque entre autres anomalies une croissance excessive de l'encéphale.

Au niveau des organes innervés, on assiste dans les conditions normales à une dégénérescence précoce de certains axones. En effet, il est élaboré au cours de l'embryogenèse trois fois plus de neurones qu'il n'en reste à la naissance. L'apoptose est indispensable et, si elle fait défaut, l'innervation fonctionnelle des organes sera perturbée ; c'est le cas de l'innervation des fibres musculaires : une jeune fibre est d'abord poly-innervée et finalement, lorsqu'elle devient fonctionnelle, elle ne présente plus qu'une seule plaque motrice.

Au cours de la formation de l'**appareil uro-génital**, qui est décrite dans le chapitre 17, ce mécanisme de l'apoptose joue aussi dans la disparition ou la modification des ébauches pronéphrétiques ou mésonéphrétiques, la disparition des canaux de Müller et des canaux de Wolff, etc.

c) Rôle dans la morphogenèse tissulaire

La formation de cavités dans des amas cellulaires est un processus fréquemment observé au cours du développement embryonnaire. L'apoptose y joue un rôle primordial. Il a été montré que le **maintien d'un contact entre lame basale et cellules de nature épithéliale était nécessaire pour la survie de ces dernières** (Ekblom et coll., 1980).

Le creusement de la cavité proamniotique chez les embryons de mammifères révèle clairement le lien existant entre processus d'apoptose et formation d'une structure épithéliale.

Chez la souris, juste avant la nidation du blastocyste, une lame basale sépare la masse cellulaire interne (MCI) d'une couche cellulaire constituant l'endoderme primaire ou hypoblaste. Les cellules hypoblastiques à l'origine de cette lame basale évoluent par la suite pour donner l'endoderme viscéral cependant que les cellules de la MCI se différencient pour former l'épiblaste (voir § 10.2). Au bout de quelques heures, les cellules épiblastiques directement au contact de la lame basale présentent un phénotype polarisé cependant que les cellules au centre de la MCI entrent en apoptose avec pour conséquence la formation de la cavité proamniotique (Coucouvanis et Martin, 1995).

Outre le rôle joué par des constituants matriciels de la lame basale (laminine par exemple) sur le maintien en survie et la différenciation phénotypique des cellules épiblastiques, le rôle des BMP a également été mis en évidence dans le déclenchement de l'apoptose des cellules de la MCI qui ne sont pas en contact avec la lame basale.

Diverses autres observations faites au cours de l'organogenèse, lors de la formation du rein par exemple, semblent confirmer le rôle joué par des lames basales dans une régulation indirecte de l'apoptose pouvant rendre compte de la formation de cavités tissulaires.

14.2.2 Apoptose et métamorphose

Les exemples de mort cellulaire les plus anciennement connus se trouvent dans les groupes zoologiques à développement indirect, chez lesquels le jeune n'a pas l'organisation définitive de l'adulte, mais passe d'abord par des stades larvaires plus ou moins longs avant de subir une métamorphose au cours de laquelle les organes définitifs se développent, cependant que d'autres se transforment ou disparaissent. C'est le cas de beaucoup d'Invertébrés, notamment des Arthropodes (Crustacés, Insectes, etc.) et de certains Vertébrés, comme les Amphibiens.

Les morts cellulaires pendant ces métamorphoses sont sous contrôle hormonal. Chez les Amphibiens, la sécrétion des hormones thyroïdiennes : la thyroxine (T4) et la Tri-iodothyronine (T3), augmente progressivement jusqu'à un maximum au moment du climax ; ces hormones vont se lier à leurs récepteurs dont le nombre augmente également. La quantité d'hormones et de récepteurs est régulée génétiquement dans les tissus des différentes parties du corps. Certains types cellulaires restent insensibles aux signaux hormonaux et ne subissent pas d'apoptose ; l'hormone T3 y subit une déiodination qui la transforme en thyronine inactive. En revanche, chez les cellules programmées pour une mort cellulaire, celles des tissus de la queue du têtard par exemple, T3 la déclenche dès qu'un certain seuil hormonal est atteint. Une ablation expérimentale de la thyroïde inhibe la résorption tissulaire de la queue ; à l'inverse, l'apport d'hormones thyroïdiennes dans l'alimentation peut provoquer une métamorphose plus précoce.

Résumé

Cet aperçu de l'apoptose montre le rôle essentiel qu'elle joue dans la morphogénèse mais aussi celui qu'elle a dû jouer dans l'évolution des espèces. Ainsi, nous avons vu que l'activité d'un seul gène, tel le gène *gremlin*, peut être le moteur d'une différence anatomique profonde entre deux organes homologues, la patte d'un poulet et la patte palmée d'un canard durant la morphogénèse de laquelle ne se produit pas d'apoptose. Chez les Amphibiens, certaines espèces dites néoténiques acquièrent la faculté de se reproduire sans avoir subi de métamorphose complète et par conséquent sans que se soient réalisées des résorptions d'organes larvaires par apoptose. Sans entrer dans l'examen des causes de ce phénomène, on se contentera de constater que ces nouvelles formes diffèrent de façon très significative de la forme qui se métamorphosait. Ainsi, dans la mesure où elle n'est pas létale, une modification de l'activité ou de la conformation d'un simple récepteur, ou bien encore de l'efficacité d'un signal, peut être la source de changements considérables.

Questions

- 14.1 En quoi les morts cellulaires par nécrose et apoptose diffèrent-elles ?
- 14.2 Quelles molécules peuvent être à l'origine de signaux de mort ?
- 14.3 Que désigne-t-on sous le terme de voie intrinsèque de l'apoptose ?
- 14.4 À quoi correspond un apoptosome ?
- 14.5 Qu'est-ce qui différencie les caspases initiatrices et activatrices ?
- 14.6 À quel niveau de la formation des membres des Tétrapodes observe-t-on des processus apoptotiques ?
- 14.7 Quelles anomalies l'absence des phénomènes d'apoptose peut-elle provoquer au cours de la neurogenèse ?
- 14.8 L'apoptose peut-elle jouer un rôle dans l'homéostasie épithéliale ?
- 14.9 Des morts cellulaires programmées s'observent-elles dans des développements indirects ?

Réponses page 391

INDUCTIONS EMBRYONNAIRES PENDANT LA GASTRULATION ET LA MORPHOGENÈSE

PLAN

- 15.1 Le centre organisateur de Spemann et Mangold dans l'induction neurogène et mésoblastogène
- 15.2 Transmission des informations pendant une induction
- 15.3 Expression des gènes régulateurs du développement pendant la gastrulation
- 15.4 Sécrétion des protéines inductrices de structures dorsales par le centre organisateur de Spemann et Mangold
- 15.5 L'induction du système nerveux et de l'épiderme
- 15.6 Formation des somites chez les Vertébrés
- 15.7 L'asymétrie droite-gauche chez les Vertébrés
- 15.8 Les inductions au cours de la différenciation de l'œil
- 15.9 Conséquences des inductions

Chez les Amphibiens, à la fin de la segmentation, avant que ne débutent les mouvements morphogénétiques, des interactions cellulaires ont provoqué l'induction d'une aire mésodermique par l'endoderme, avec un centre organisateur dans le mésoderme dorsal, le **centre organisateur de Spemann et Mangold**. Avec les mouvements morphogénétiques, des ensembles de cellules aux contenus cytoplasmiques différents, provenant de régions distinctes de l'œuf entrent en contact. Certains sont déjà déterminés, notamment ceux qui constituent les territoires mésodermiques et exercent des inductions sur d'autres tissus non déterminés mais aptes à répondre à cette influence ; cette réceptivité est appelée **compétence**. Les aires embryonnaires déterminées orientent ainsi la différenciation ultérieure des secondes ; le choix des gènes activés s'effectue par une cascade de mécanismes que l'on commence à déchiffrer. Les cellules induites à se différencier seront à leur tour déterminées (voir encart 15.1).

La gastrulation est une étape privilégiée du développement pour l'étude des mécanismes des inductions, avec la détermination de l'aire neurale et de l'aire épidermique dans l'ectoderme, celle des différentes régions du mésoderme axial dorsal, latéral et ventral. Il faut encore rappeler qu'il n'y a aucune solution de continuité entre ces étapes de la morphogenèse et celles que nous avons étudiées pendant la segmentation.



15.1 Spécification et détermination

La **spécification**, première phase de l'engagement cellulaire dans une voie de différenciation spécifique, se distingue de la **détermination**, par le fait que les cellules spécifiées peuvent, sous l'influence de facteurs externes, se différencier d'une manière autre que celle à laquelle elles étaient destinées. Révélant leur caractère engagé dans une voie de différenciation, ces cellules sont capables de s'auto-différencier à condition que le milieu où elles se trouvent soit neutre, c'est-à-dire non susceptible de fournir des stimuli capables de modifier la voie dans laquelle le processus de différenciation est engagée. Ce cas peut être réalisé expérimentalement lors de cultures *in vitro* par exemple. En revanche des cellules déterminées, placées dans un environnement non neutre (greffe ectopique par exemple), sont capables de s'auto-différencier sans modification de leur destinée initiale. L'engagement dans la voie de la différenciation puis son déroulement sont devenus irréversibles.

Les mécanismes d'inductions en cascade se retrouvent à toutes les étapes des organogenèses.

On étudiera à titre d'exemples la différenciation des somites à partir du mésoderme para-axial et la formation de l'œil à partir de l'encéphale et de l'épiderme céphalique. Avec la somitogenèse, nous rencontrerons un mode de transmission d'information par contact intercellulaire ; avec la formation de l'œil, siège de nombreuses inductions, nous évoquerons une autre catégorie de gènes organisateurs du développement.

15.1 LE CENTRE ORGANISATEUR DE SPEMANN ET MANGOLD DANS L'INDUCTION NEUROGÈNE ET MÉSOBLASTOGÈNE

Chez tous les Vertébrés, le territoire du mésoderme s'invagine sous l'ectoderme pendant la gastrulation. Le mésoderme axial y induit la formation d'une plaque neurale qui se referme en un tube terminé par une vésicule céphalique ; le mésoderme ventral induit la différenciation de l'ectoderme en épiderme. Au sein du mésoderme, la zone axiale fournit le mésenchyme céphalique issu du mésenchyme précordial au niveau de la tête et se différencie en une corde au niveau du tronc ; de part et d'autre de la corde sont induits les somites, les pièces intermédiaires et les formations ventrales. C'est à la fin de la gastrulation que le plan d'organisation commun à tous les Vertébrés est identifiable.

Il existe chez les Vertébrés une grande uniformité dans les mécanismes fondamentaux de la gastrulation, dans les inductions, la nature des gènes activés pendant cette période et les protéines inductrices (voir encart 15.2). Aussi avons-nous choisi de prendre l'essentiel des données expérimentales chez les Amphibiens, en mentionnant plus succinctement les résultats analogues mis en évidence dans les autres groupes.

ENCART 15.2 Caractère général de l'induction neurogène et mésoblastogène

Des expériences d'implantations de région cordo-mésodermique ont été faites sur des Poissons, Oiseaux et Mammifères avec, chez les deux derniers, prélèvement du nœud de Hensen qui correspond à l'organisateur primaire ; sa greffe a induit du tissu nerveux dans l'ectoderme.

Il n'y a d'ailleurs **pas de spécificité zoologique**. En effet, après implantation d'une lèvre dorsale prélevée sur la jeune gastrula d'une espèce d'Amphibien, dans le blastocèle d'une blastula d'une autre espèce d'Amphibien, on obtient la formation d'un second système nerveux, mais les formations mésodermiques greffées ne se combinent pas à celles de l'hôte qui élabore les siennes propres. La greffe d'un nœud de Hensen de souris sur une aire embryonnaire d'embryon de poulet, induit également la formation d'une corde et d'un tube neural secondaire. Les échecs sont cependant d'autant plus importants que les espèces sont plus éloignées.

15.1.1 Les expériences de Spemann et Mangold (1924)

Elles ont montré le rôle du mésoderme axial dans l'induction neurogène et mésoblastogène.

C'est la première induction qui ait été démontrée. La lèvre dorsale du blastopore d'une jeune gastrula pigmentée de *Triturus vulgaris* est prélevée puis implantée à l'emplacement du mésoderme ventral d'une gastrula de même âge de *Triturus cristatus* de teinte plus claire. On respecte une concordance entre l'orientation antéro-postérieure du greffon et celle du receveur. La différence de pigmentation permet d'identifier et de suivre la différenciation des tissus provenant du greffon et du porte-greffe (fig. 15.1). Chez le porte-greffe, la gastrulation se déroule normalement mais un second blastopore se forme au niveau du greffon. À la neurulation, deux plaques neurales apparaissent, une plaque surnuméraire se trouvant latéralement, à l'emplacement de la greffe. Sur coupes histologiques, la différence de pigmentation permet de reconnaître les parts respectives du greffon et de l'hôte dans la formation de l'embryon secondaire. Le greffon y forme la plus grande partie de la corde, une petite partie des somites. Les autres organes de l'embryon secondaire qui se développent sont fournis par les tissus de l'hôte, c'est le cas notamment du tube neural, du restant de la corde et des somites, des pièces intermédiaires, d'un tube digestif incomplet plus ou moins fusionné avec celui de l'hôte. Des précisions confirmant la destinée du greffon ont été apportées par des travaux refaisant l'expérience avec des greffons marqués à la thymidine ^3H (Capuron, 1968).

Le greffon a une influence complexe. Lors de la transplantation il était déjà **déterminé** (voir chap. 12) et il s'est différencié en fonction de sa détermination.

C'est en outre à son contact que l'ectoderme ventral édifie le système nerveux (**induction neurogène**) et que le mésoderme présomptif des lames latérales édifie des somites et des pièces intermédiaires suivant un gradient dorso-ventral imposé

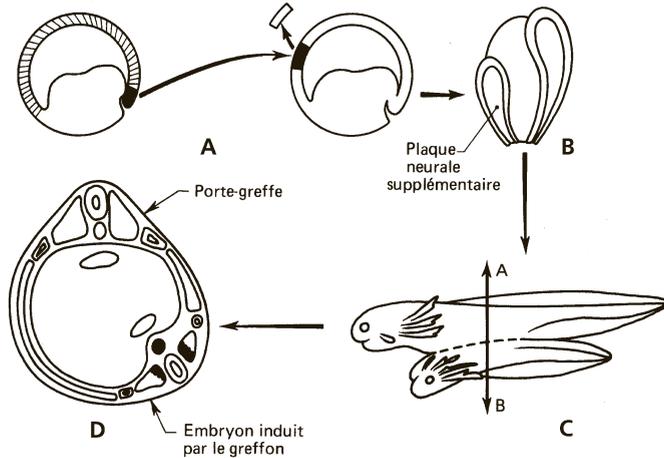


Figure 15.1 - Schéma de l'expérience de Spemann et Mangold.

A : Une lèvre blastoporale de jeune gastrula d'une espèce pigmentée est greffée en position ventrale chez un récepteur clair. **B** : Formation d'une seconde plaque neurale consécutive à une double gastrulation. **C** : Différenciation d'un embryon double. **D** : Coupe transversale à travers cet embryon double. Une partie seulement des tissus de celui-ci (en noir) provient du greffon, le restant provient de la gastrula porte-greffe.

par le greffon (**induction mésoblastogène**). Il n'y a dans l'endoderme que des formations endodermiques puisqu'il est totalement déterminé au début de la gastrulation (voir chap. 12).

Le mésoderme de la lèvre dorsale du blastopore peut donc contrôler et coordonner la différenciation des tissus ectodermiques sus-jacents et mésodermiques latéraux. On considère que les différenciations induites par cette greffe miment l'action du centre organisateur lorsqu'il occupe sa position normale. Cet inducteur était qualifié de « **primaire** », car on considérait qu'il contrôlait les premières différenciations. On sait maintenant que cette « **induction primaire** » est en fait précédée par des inductions qui déterminent le devenir mésodermique de la zone marginale de l'embryon.

L'embryon secondaire étant harmonieusement développé, Spemann a donné le nom de **centre organisateur**¹ à l'aire mésodermique bordant la lèvre dorsale du blastopore qu'il a greffée ventralement. Ce centre organisateur correspond à une région de l'œuf remaniée lors de la pénétration du spermatozoïde et située au-dessus du centre de Nieuwkoop.

L'expérience de Spemann et Mangold crée une situation anormale où un organisateur est greffé ventralement. La différenciation neurale surnuméraire observée dans ces conditions ne résulterait-elle pas de la migration des cellules originaires du

1. Découvertes qui valurent un prix Nobel à Spemann en 1935, H. Mangold étant décédée accidentellement. On appelle fréquemment ce centre du seul nom de Spemann.

neuroderme présomptif dorsal ? On sait en effet que les mouvements cellulaires à la gastrulation ne sont pas aussi ordonnés qu'il y paraît et que des migrations apparemment anarchiques existent (chap. 8).

Il a été montré que les cellules du tube neural secondaire sont bien originaires de l'ectoderme ventral. Un colorant fluorescent non diffusible (Fluorescéine-lysine-dextran ou FLDX) est injecté dans les cellules ectodermiques ventrales d'une très jeune blastula, normalement destinées à former de l'épiderme. Un organisateur est ensuite greffé au début de la gastrulation, en position ventrale, comme dans l'expérience de Spemann. Le tube neural formé est constitué de cellules fluorescentes, preuve que celles-ci proviennent bien de l'ectoderme ventral (Slack et coll., 1984).

15.1.2 Caractéristiques du centre organisateur de Spemann et Mangold

Le centre de Nieuwkoop sécrète des protéines inductrices qui activent la synthèse de facteurs de transcription dans le mésoderme dorsal, c'est-à-dire le centre organisateur de Spemann et Mangold (voir § 12.5.4). L'origine des cellules du centre de Spemann a été établie chez le xénope depuis le stade 32 cellules avec des techniques de marquage fluorescent (Vodicka et Gerhart, 1995). Elles proviennent toutes des 3 paires de blastomères dorsaux A1, B1 et C1 (fig. 12.7D).

Ce centre organisateur est régionalisé. Il fournit l'endoderme pharyngien, le mésoderme précordial ou céphalique et la corde. L'endoderme pharyngien migrant le premier dans le blastocèle de la jeune gastrula induit les structures céphaliques antérieures (formation olfactive par exemple), le mésoderme céphalique induit le cerveau antérieur et moyen, la corde induit le cerveau postérieur et les structures du tronc.

a) Il est nécessaire que le mésoderme du centre organisateur soit étalé sous l'ectoderme dorsal pour assurer une transmission verticale de l'induction et la formation d'un axe nerveux complet

L'observation d'une gastrulation normale montre que le mésenchyme céphalique et le mésoderme axial entrent en contact avec l'ectoderme et on pense que c'est alors que l'information est transmise par des protéines inductrices sécrétées. C'est ce que montrent les expériences d'**exogastrulation** de Holtfreter (1933) sur diverses espèces (axolotl, rainette, grenouille), expériences reprises par d'autres sur le xénope (fig. 15.2). Il dégage des blastulas qui sont plongées dans une solution hypotonique de NaCl, le pôle végétatif vers le haut. Il se développe 17 % des germes et leur gastrulation est anormale : les feuilletts endo-mésodermiques ne s'invaginent pas à l'intérieur des tissus ectodermiques mais s'étirent vers l'extérieur, constituant une formation dite «en battant de cloche». Ectoderme et cordo-mésoderme ne sont reliés que par un fin pédoncule. Ils sont en continuité mais ne sont pas superposés.

Dans ces exogastrulas, des formations endo-mésodermiques organisées se différencient. A l'extérieur, on trouve l'endoderme inversé, différencié, avec ses annexes glandulaires. À l'intérieur, la plaque précordale a formé du mésenchyme céphalique,

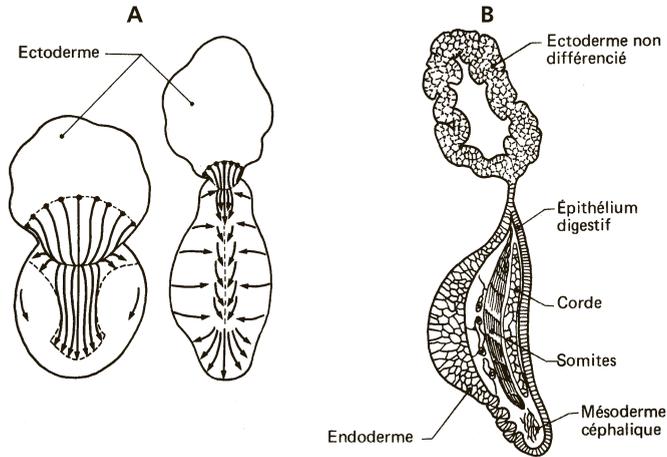


Figure 15.2 - Exogastrulation.

A : Les mouvements du mésoderme et de l'endoderme (représentés par des flèches) sont dirigés vers l'extérieur, et non vers l'intérieur du blastocèle comme dans une gastrulation normale.

B : Tous les tissus endodermiques et mésodermiques se différencient normalement. L'ectoderme reste atypique (d'après Holtfreter 1933).

la corde se différencie ainsi que des somites en une seule rangée impaire, des pièces intermédiaires et des lames latérales. Les tissus ectodermiques quant à eux, restent indifférenciés : ils ne donnent ni épiderme, ni tissu nerveux, ce qui montre que ces différenciations exigent la superposition du mésoderme et de l'ectoderme et la transmission de l'information de l'un vers l'autre, ce qui n'est pas réalisé dans l'expérience. Le mésoderme a cependant conservé son pouvoir inducteur : si des fragments d'ectoderme sont greffés sur le mésoderme de l'exogastrula, des formations nerveuses caudales, troncales ou céphaliques s'y différencient, suivant la région du mésoderme sur laquelle le greffon a été déposé.

b) Des informations peuvent aussi circuler par transmission horizontale au sein d'un même feuillet et permettre un certain niveau de différenciation

Les expériences réalisées chez le xénope amènent à nuancer ces résultats. Un certain degré de neuralisation est obtenu dans les exogastrulas et l'inducteur se transmet «horizontalement» entre le mésoderme axial et l'ectoderme qui se trouvent en continuité. Il n'apparaît jamais de tube neural, mais des marqueurs moléculaires neuraux, comme la N-CAM, sont exprimés.

L'expression de marqueurs neuraux dans de l'ectoderme de gastrula est aussi obtenue dans des cultures *in vitro* de régions dorsales de jeunes gastrulas de xénope où l'explant est disposé de façon telle que le mésoderme ne puisse glisser sous l'ectoderme, mais qu'il s'étende sur le même plan en restant en continuité avec

celui-ci. Non seulement des marqueurs généraux de tissu neural (N-CAM, NF3) sont exprimés, mais des gènes spécifiques de certaines régions du cerveau moyen et postérieur, ainsi que de la moelle épinière s'expriment dans l'explant suivant une distribution antéro-postérieure identique à celle d'un embryon normal. Il n'apparaît pas de marqueur de cerveau antérieur (Doniach et coll., 1992).

Les cellules du mésoderme axial porteuses de cette information « horizontale » seraient celles qui constituent le feuillet épithélial superficiel tandis que les cellules vectrices de l'induction « verticale » seraient celles du mésenchyme profond, comme le mésenchyme précordal, inducteur du cerveau antérieur. La notion de transmission « horizontale » d'un inducteur au sein d'un même feuillet embryonnaire sera précisée plus loin dans ce chapitre.

c) Les limites dans l'espace du centre organisateur correspondent à l'aire du croissant gris

Cette aire est à l'origine des territoires de la corde, de la plaque précordale, de l'endoderme pharyngien ; ce sont les tissus qui, dans la gastrula, forment le toit de l'archentéron. On peut préciser ses limites grâce aux méthodes de greffe dans la région ventrale ou d'implantation des fragments à tester dans le blastocèle d'une blastula âgée. Si le greffon peut provoquer une induction neurogène, une plaque nerveuse secondaire se différenciera dans l'ectoderme ventral.

Le contact d'un tissu avec un inducteur peut permettre la transmission des potentialités inductrices : la plaque neurale devient elle-même inductrice et, implantée dans le blastocèle d'une jeune gastrula, elle induit des différenciations nerveuses.

Une partie du centre organisateur suffit pour donner un embryon harmonieux à la condition que la polarité céphalo-caudale soit respectée. C'est ce qui permet la formation d'embryons normaux à partir de moitiés de blastula ou de gastrula dans les expériences de régulation des déficiences (voir § 12.3.2a).

d) Évolution dans le temps des capacités inductrices du centre organisateur

Ce territoire qui représente la zone dorsale du blastopore est inducteur dans sa totalité au début de la gastrulation. À la fin de la neurulation, la corde seule a conservé des capacités inductrices. En effet, pendant la période où l'inducteur agit, ses potentialités évoluent, ainsi que la « compétence » de l'ectoderme qui vient à son contact (voir *infra*).

• **Le centre organisateur acquiert une régionalisation pendant la gastrulation.** Des expériences nombreuses, réalisées sur des espèces différentes, montrent que la capacité d'induire des structures céphaliques n'est acquise qu'après l'invagination de la plaque précordale, partie du centre organisateur qui correspond normalement au mésoderme céphalique. Okada et coll. (1942), par exemple, montrent chez un triton (g. *Cynops*), qu'un explant de lèvre blastoporale prélevé lorsque celle-ci se forme, pour être greffé en position ventrale sur un autre embryon au même stade, induit des formations secondaires typiques du niveau du tronc, notamment du tube neural. Si le même explant est cultivé pendant 12 à 24 heures, et a donc vieilli avant d'être réim-

planté dans un embryon de même âge que précédemment, il induit des structures de système nerveux céphalique. Après ce délai, il a donc acquis des potentialités d'inducteur céphalique qu'il n'avait pas dans la première partie de l'expérience.

Le même résultat est obtenu si, laissant la gastrulation se dérouler normalement, on prélève le même territoire (correspondant au mésoderme axial antérieur qui forme le toit de l'archentéron), soit à la mi-gastrula, soit sur la gastrula âgée quand il aura gagné sa position antérieure définitive. Si chacun de ces greffons est réimplanté dans un embryon receveur en position ventrale, ce n'est que dans le dernier cas qu'on obtiendra les structures céphaliques bien développées.

- Ces travaux montrent qu'une évolution se produit dans le centre organisateur et que **la capacité d'induire des structures céphaliques n'apparaît que pendant la gastrulation**. En utilisant des receveurs d'âge constant, on élimine la possibilité d'une évolution de la compétence de l'ectoderme qui varie aussi avec le temps. Des expériences qui consistent à bloquer les mouvements de la gastrulation à différents stades (Gehart et coll., 1984) confirment ces conclusions : dans des gastrulas de xénope bloquées à la mi-gastrula, il ne se forme que du tube neural, c'est-à-dire une structure du tronc. Si la gastrulation est presque complète, les contacts entre mésoderme céphalique et ectoderme étant les seuls à n'être pas totalement établis, le tube neural est normal, la vésicule céphalique se forme, mais des déficiences y subsistent.

- Il est actuellement considéré (von Dassow et coll., 1993), que **l'organisateur de Spemann pourrait se décomposer en deux éléments** :

- une zone marginale, la plus proche de l'endoderme inducteur, qui est déterminée dès la jeune blastula; elle formera le mésoderme précordial et sera l'inducteur céphalique ;

- une zone immédiatement voisine de la précédente et induite par celle-ci dès le stade jeune blastula, qui formera l'organisateur axial, et donnera la corde ; cette zone induira la formation du tube neural et agira latéralement avec les précurseurs du mésoderme para-axial, pour y induire la différenciation de mésoderme somitique. La répartition des protéines régulatrices et inductrices, actuellement connues, confirme cette interprétation (voir § 15.4).

e) Notion de compétence

Dans toute induction, il y a deux tissus : celui qui émet une information, le **tissu inducteur** et celui qui la reçoit, le **tissu cible** ou **tissu réacteur**. Nous examinerons d'abord la caractéristique du tissu réacteur à savoir, son aptitude à percevoir une information, ou **compétence**, avant d'aborder l'étude de la nature de l'information transmise par le tissu inducteur.

La notion de compétence définie par Waddington (1940), signifie qu'un tissu embryonnaire est compétent vis-à-vis d'un inducteur lorsqu'il se trouve en état de répondre par une différenciation s'il est soumis à l'action de celui-ci.

L'acquisition de la compétence d'un tissu est fonction de son âge; elle est progressive. Elle exige qu'ait déjà eu lieu une série d'activations de gènes dans les stades antérieurs du développement. La compétence peut s'exprimer de diverses

façons, par exemple par la présence en quantité suffisante de récepteurs à la molécule inductrice : on a ainsi montré, dans la mi-blastula, une forte augmentation des récepteurs au FGF dans le territoire qui devient compétent pour former du mésoderme ventral ; leur nombre diminue ensuite fortement dès la gastrulation. Le nombre des récepteurs ne détermine pas à lui seul le niveau de compétence d'un territoire : ainsi l'activine participe à la dorsalisation du mésoderme mais la densité de récepteurs à l'activine est uniforme dans tout l'embryon.

La compétence d'une cellule vis-à-vis d'un inducteur peut aussi être modifiée par l'inactivation de ses récepteurs, le défaut de transduction du signal du fait de l'absence d'un élément de la chaîne moléculaire reliant le récepteur au noyau, ou encore par la répression du gène cible.

Dans certains cas, le programme établi antérieurement dans une ébauche ou un feuillet embryonnaire, c'est-à-dire l'état de sa compétence, semble suffisamment avancé pour que sa réalisation soit rendue possible par l'action complémentaire d'une induction peu spécifique, ce sont les cas d'**induction permissive**. Dans d'autres cas, l'information apportée par l'induction doit être plus précise, car la compétence du tissu cible est peu définie, et ses potentialités encore très larges, ce sont alors des **inductions instructives**.

f) Compétence de l'ectoderme pour former du tissu nerveux

L'ensemble de l'ectoderme n'acquiert cette compétence qu'au début de la gastrulation. Seul l'ectoderme dorsal est normalement induit à donner des formations neurales, mais l'ectoderme ventral peut également l'être expérimentalement, comme le montre la greffe de Spemann chez le triton.



Cette compétence de l'ectoderme n'est pas générale dans toutes les espèces ; chez le xénope, l'ectoderme ventral, placé expérimentalement au contact du mésoderme dorsal (Sharpe, 1987), ou cultivé en présence d'activine (Sokol et coll., 1991), n'exprime que très peu de caractères spécifiques du tissu neural à la différence de ce qu'on obtient avec de l'ectoderme dorsal. Cette différence de compétence de l'ectoderme neural est établie dès la transition blastulésienne. Le territoire ventral de son côté exprime une protéine caractéristique de l'épiderme, Epi1, cependant qu'une protéine kinase spécifique présente dans le neurectoderme en est absente.

La compétence de l'ectoderme évolue dans le temps. Un fragment d'ectoderme compétent de jeune gastrula, prélevé et cultivé dans une solution de Holtfreter puis réimplanté dans la plaque neurale d'une jeune gastrula, perd progressivement l'aptitude à se différencier en ébauches neurales typiques. Il s'en formera d'un type d'autant plus postérieur que la culture préalable à l'implantation aura duré plus longtemps : d'abord cerveau antérieur, puis cerveau moyen, cerveau postérieur, tube neural et crêtes neurales ; au-delà, toute compétence neurale disparaît. Par contre, l'ectoderme céphalique devient compétent pour former des placodes cristalliniennes, otiques, olfactives. Cette évolution mime celle qu'on observe chez l'embryon.

La modification dans le temps de la compétence est généralisable à des tissus cibles autres que le seul ectoderme.

En résumé

L'embryologie expérimentale a montré que dans les conditions d'un développement normal, des tissus inducteurs dont les potentialités se modifient en quelques heures, ont des contacts qui changent sans cesse, avec des tissus cibles dont la «compétence», c'est-à-dire la réceptivité à une information provenant de l'inducteur, évolue aussi.

On peut retenir que deux catégories de signaux sont émis par le centre organisateur vers l'ectoderme dorsal ; l'une, la première, constituée de signaux de différenciation neurale céphalique transmis verticalement, l'autre constituée de signaux de différenciation neurale caudale transmis dans le plan de l'épithélium superficiel depuis le mésoderme du centre inducteur vers l'ectoderme neural. Dans le même temps, des signaux émis latéralement depuis le mésoderme axial induisent la différenciation de structures somitiques et de pièces intermédiaires.

Le centre organisateur de Spemann et Mangold est polarisé dès l'apparition de la lèvre blastoporale. On progresse dans la connaissance des gènes de polarité qui s'expriment quand s'établit l'axe céphalo-caudal lors de la gastrulation. Le système d'organisation de l'embryon de drosophile avec l'existence de gènes de polarité et de gènes régulateurs homéotiques s'exprimant suivant un axe antéro-postérieur chez cet insecte peut servir de modèle pour interpréter le cas des Amphibiens ; il est en effet maintenant bien admis et démontré à maintes reprises que les grandes règles du fonctionnement de ces gènes sont les mêmes chez les Insectes et dans d'autres embranchements de Métazoaires, dont les Vertébrés.

15.2 TRANSMISSION DES INFORMATIONS PENDANT UNE INDUCTION

On sait depuis quelques décennies que les inducteurs sont des protéines sécrétées mais c'est depuis une vingtaine d'années seulement que les techniques de la biologie et de la génétique moléculaires ont été consacrées à leur identification.

Il a fallu de nombreuses expériences depuis les travaux de Spemann et Mangold pour déterminer la nature d'une substance inductrice neurogène. Très tôt, on s'est rendu compte qu'un certain niveau de différenciations neurales ou mésodermiques pouvait être atteint en utilisant des substances isolées à partir de tissus embryonnaires ou adultes provenant de diverses espèces, notamment de Mammifères et d'Oiseaux. Ces tissus, dont on pouvait espérer extraire les protéines actives plus aisément que des tissus peu abondants de lèvres blastoporales de gastrulas, ont été appelés **inducteurs hétérogènes**. Leur emploi a notamment permis d'établir une interprétation de l'induction neurale suivant un double gradient (voir encart 15.5) qui est confirmée par les données les plus récentes.

15.2.1 Rôle des protéines inductrices

Ces protéines sont sécrétées, elles agissent à faible distance (**action paracrine**) et se lient avec des récepteurs de la membrane plasmique des cellules compétentes sans pénétrer dans la cellule.

Les récepteurs des cellules compétentes sont des protéines membranaires à activité de protéines kinases ou couplées à des protéines kinases. Ils possèdent un domaine extracellulaire dont la conformation permet la reconnaissance spécifique de la protéine inductrice, un (ou plusieurs) domaine(s) transmembranaire(s) et un domaine cytoplasmique, premier maillon d'une voie de transmission (ou transduction) des signaux vers le noyau.

La plupart des protéines inductrices sont des facteurs de croissance qui ont des récepteurs à activité tyrosine-kinase ou sérine/thréonine kinase (voir § 11.1.2). D'autres récepteurs sont couplés à une adénylate cyclase dont l'activation catalyse la formation d'AMP cyclique à partir d'ATP. L'activation des protéines kinases liées à ces différents types de récepteurs induit des phosphorylations en cascade de kinases au sein du cytoplasme pour aboutir à la phosphorylation de protéines régulatrices ; celles-ci passent dans le noyau où elles agissent sur la transcription du génome. L'activation de la protéine-kinase C (PKC) est un autre type de transmission des signaux ; l'enzyme, sous sa forme membranaire, transmet les signaux d'hormones et de certains facteurs de croissance. C'est ainsi qu'on constate que, dans le neurectoderme d'une gastrula, l'activité de la PKC membranaire augmente de 3 à 4 fois, tandis que la PKC du cytosol, forme inactive, diminue.

15.2.2 Rôle des contacts entre tissu inducteur et tissu induit

Les expériences *in vitro* mentionnées plus haut laissent penser que l'inducteur est sécrété par les cellules inductrices et se lie aux récepteurs membranaires des cellules réceptrices. Cette règle n'a pas une valeur générale. En effet, des observations réalisées *in vivo* et *in vitro* montrent que des contacts cellulaires sont nécessaires dans certains cas pour que l'induction ait lieu.

a) Observations histologiques

Des contacts cellulaires existent déjà dans la blastula entre cellules voisines d'un même territoire et ils se renforcent à la gastrulation. Par ailleurs, la microscopie électronique par transmission ou à balayage a permis de mettre en évidence au cours de la gastrulation, l'existence de processus cellulaires émis par le mésoderme et l'ectoderme qui entrent en contact étroit entre eux (Tarin, 1972; Nakatsuji, 1976). Des contacts entre tissus induits et inducteurs s'observent d'ailleurs dans les inductions morphogénétiques de tous les organes (voir encart 15.3).

15.2.3 Activation de voies de transduction par contact cellulaire

Un contact direct entre deux cellules peut être à l'origine de l'activation d'une voie de transduction, un constituant membranaire de la cellule inductrice étant reconnu par un récepteur membranaire porté par la cellule cible. Ce mode d'**interaction** dit **juxtacrine** est illustré par les systèmes Delta/Notch et Ephrines/Eph (voir 11.1.2f).



ENCART 15.3 Emploi de filtres en culture de tissu : une nouvelle interprétation d'une expérience ancienne

L'examen plus attentif d'une expérience ancienne apporte une preuve supplémentaire de l'existence de contacts cellulaires. Dans cette expérience, ce sont du mésenchyme rénal et de l'épithélium d'uretère qui interagissent. On avait cru démontrer la diffusion de substances inductrices, en interposant *in vitro* des filtres aux pores calibrés destinés à ne laisser passer que des molécules d'une taille donnée. L'emploi de ces filtres n'inhibait pas l'induction si l'épaisseur n'était pas trop importante et si le diamètre des pores était suffisant. Les auteurs en concluaient qu'une substance diffusant depuis l'inducteur se trouvait freinée par des pores de faible diamètre. En réalité des observations ultrastructurales de coupes à travers les tissus séparés par un filtre Millipore ont démontré que des prolongements cellulaires traversent des pores de 0,2 μm et que, par leur intermédiaire, tissus inducteur et compétent entrent en contact après 15 heures de culture (Toivonen et Wartowa, 1976). Ils ne traversent pas les filtres qui sont à pores trop fins (0,1 μm), ou dont l'épaisseur est trop grande. Dans ces dernières conditions, l'induction n'a pas lieu.

Dans l'interprétation de cette expérience, on peut écarter l'idée du rôle d'une diffusion : en effet, des composés de poids moléculaires élevés (10^7 daltons) égaux à celui des protéines éventuellement inductrices, traversent aisément et rapidement les filtres de 0,1 μm alors que ces mêmes filtres s'opposent à l'induction.

Le système Delta/Notch est répandu dans tout le règne animal, décrit par exemple chez *C. elegans*, chez la drosophile, chez les Vertébrés. La liaison de ligands membranaires Delta (ou Serrate et Jagged) avec le récepteur transmembranaire Notch provoque une attaque protéolytique du domaine intracytoplasmique de ce dernier et la libération d'un fragment qui pénètre dans le noyau de la cellule cible. Ce fragment se lie avec un facteur de transcription de la famille CSL, et le complexe formé permet l'activation de gènes cibles (fig.11.2).

Le système éphrines/Eph se distingue du précédent dans le fait que les interactions s'établissent entre les cellules porteuses des ligands éphrines et celles exprimant les récepteurs tyrosine-kinase Eph : une transduction de signal peut s'effectuer dans chacune des deux cellules en contact.

Ces deux systèmes interviennent dans de nombreux processus morphogénétiques. Nous verrons plus loin un exemple du rôle de ces voies lors de la somitogenèse chez les Vertébrés (voir § 15.6).

Un autre mode de relations cellulaires plus étroit encore peut fonctionner entre des cellules en contact : celui des jonctions communicantes.

15.2.4 Rôle des jonctions communicantes dans la circulation des signaux d'induction

Ces jonctions ont été définies dans le § 13.3.

L'implantation de microélectrodes montre que la résistance électrique de part et d'autre de membranes couplées par ces jonctions est aussi faible qu'au sein d'une

même cellule (Lowenstein, 1971). Leur existence et leur fonctionnement au cours de l'induction sont recherchés par l'étude de couplage électrique entre tissus inducteurs et tissus induits ou par celle de la circulation d'une cellule à l'autre de petites molécules fluorescentes, comme le jaune Lucifer.

On constate que les mésodermes et ectodermes dorsaux sont couplés pendant la gastrulation du xénope, ainsi que la corde et la plaque neurale chez la neurula. Cependant, le rôle exact des jonctions dans l'induction neurale n'est pas connu.

Le fonctionnement des jonctions communicantes dans la morphogénèse est démontré. Il est possible de bloquer ce fonctionnement chez l'embryon de xénope au stade 8 cellules, en injectant dans un ou plusieurs blastomères des anticorps spécifiques dirigés contre les connexines ; on vérifie leur efficacité avec le jaune Lucifer. Si les deux blastomères dorso-végétatifs sont injectés, toute la zone où est induit le mésoderme dorsal aura des jonctions non fonctionnelles jusqu'à la gastrulation. Dans ces conditions, la segmentation se poursuit normalement mais on relève au cours de la morphogénèse une forte proportion de malformations qui indiquent un défaut d'effet inducteur du mésoderme : microcéphalie, absence de toute structure céphalique, déficience complète de tous les organes axiaux.

15.2.5 Rôle de la matrice extra-cellulaire

Les nombreuses molécules qui constituent la matrice extra-cellulaire (collagène, fibronectine, laminine, tenascine, glycosaminoglycannes et protéoglycannes...) créent un micro-environnement cellulaire qui joue un rôle essentiel dans le développement en intervenant dans la transmission de signaux, la réalisation de mouvements morphogénétiques et l'organisation des structures tissulaires. Dans ces différents processus, les interactions moléculaires s'avèrent complexes en raison de la grande diversité dynamique des éléments mis en présence (existence de nombreuses isoformes, variabilité des conditions d'accessibilité aux domaines de liaison, modulation de l'expression des récepteurs membranaires...).

C'est ainsi que dès la gastrulation, un épithélium ectodermique, puis un épithélium neural ne peuvent se différencier à la suite des inductions que si des molécules de la matrice, notamment la laminine, s'agencent entre elles et constituent des lames basales servant de soubassement aux formations épithéliales. La lame basale assume un rôle structural (support et adhérence de la structure épithéliale) et joue un rôle déterminant dans le maintien à l'état différencié des cellules sus-jacentes (voir § 14.2.1). Ceci met en jeu de façon privilégiée certains constituants membranaires, en particulier les intégrines.

Dans des organogénèses, comme celle du foie ou des glandes mammaires, l'induction de certains facteurs de transcription dépend de la liaison des cellules à la lame basale. Dans certains cas, la matrice stabilise les ébauches en jouant un rôle protecteur vis-à-vis de l'apoptose ; les chondrocytes des ébauches de membres ou des vertèbres ne survivent puis ne forment d'ébauches du squelette que s'ils se trouvent enveloppés par la matrice et liés à ses composants par des intégrines. C'est ainsi que des chondrocytes d'embryon de poulet dégénèrent s'ils sont incubés en présence d'anticorps dirigés contre les intégrines, ce qui les rend incapables de se lier à la matrice.

Au cours de la formation de l'œil, la matrice intercellulaire entre le cristallin et la vésicule optique voit sa densité augmenter pendant l'induction du cristallin. Certains des constituants de la matrice ont été synthétisés par des cellules de l'une ou l'autre de ces deux ébauches. Ils pourraient jouer un rôle de ciment en fixant dans un espace donné, les cellules du territoire du cristallin par l'intermédiaire de liaisons établies avec les intégrines. Les cellules, qui se divisent activement, seraient ainsi contraintes de s'organiser en placodes sur un espace restreint (Hendrix et Zwaan, 1975).

Une séquestration et une certaine protection des molécules inductrices contre des protéases peuvent être également exercées par des constituants matriciels en raison d'affinités spécifiques. C'est, semble-t-il, ce qui se passe entre des facteurs de croissance affins pour l'héparine, tels les FGF ou le HGF, et des protéoglycannes membranaire et/ou de la matrice extra-cellulaire.

15.3 EXPRESSION DES GÈNES RÉGULATEURS DU DÉVELOPPEMENT PENDANT LA GASTRULATION

Les protéines inductrices du mésoderme, synthétisées dans le centre organisateur de Nieuwkoop induisent l'expression de facteurs de transcription dans la zone marginale devenue le territoire mésodermique.

15.3.1 Répartition des facteurs de transcription dans le mésoderme

Les facteurs de transcription sont répartis dans le centre organisateur de Spemann et le mésoderme latéro-ventral suivant une topographie bien définie. Les facteurs qui déterminent la polarité des territoires sont localisés au début de la gastrulation dans la zone marginale dorsale puis dans le mésoderme axial. Ce sont des protéines qui ne sont pas sécrétées mais qui régulent l'activité d'autres gènes. Elles sont synthétisées **après la transition blastulénne**, en réponse aux inducteurs du **centre de Nieuwkoop**. Dans la région ventro-latérale, d'autres gènes à homéo-boîte sont exprimés.

Les travaux classiques d'embryologie expérimentale avaient déjà montré, en transplantant des fragments du centre organisateur, que le type de structure induite dépend de la position d'origine du fragment transplanté par rapport à la lèvre blastoporale. Il était ainsi apparu que ce territoire présentait une polarité antéro-postérieure, à laquelle correspondent les gènes de polarité qui s'expriment pendant la gastrulation.

Les gènes exprimés dans le centre organisateur de Spemann et Mangold codent non seulement pour des facteurs de transcription (Goosecoïd, Xlim, Xanf-1, Xnot-2), mais aussi pour des facteurs diffusibles : des facteurs de croissance de la famille de Nodal (Xnr-1, Xnr-2 et Xnr-4), des facteurs de croissance antagonistes (Noggin, chordin, follistatine, Frizbee, Dickkopf, Cerberus), et des protéines morphogénétiques anti-dorsalisantes.

D'après le modèle de Harland et Gerhart (1997), on peut distinguer quatre domaines d'expression des gènes organisateurs de la tête et du tronc :

- L'endomésoderme antérieur qui est le site d'expression de *cerberus*, *dickkopf-1*, *Xnr-1*, *Xnr-2*, *Xnr-4*, *Xhex*, *XBlimp-1*.
- Le mésoderme précordial qui est le site de *chordin*, *follistatine*, *frizbee*, *dickkopf-1*, *goosecoïd*, *Xlim-1*, *X0tx-2*, *Xanf-1*.
- Le feuillet superficiel au-dessus de la lèvre blastoporale qui est le site de *Xnr-3* et de *chordin*.
- L'organisateur du tronc, constitué par le cordonmésoderme qui est le site de *chordin*, *noggin*, *follistatine*, *dickkopf-1*, *Xnot-2*.

15.3.2 Participation du gène *goosecoïd* à l'établissement de la polarité céphalique et à l'organisation du mésoderme axial

a) Induction du gène *goosecoïd*

On considère actuellement que Siamois et des TGF- β (Nodal, Vg1 et activine) participent conjointement, à l'induction optimale du gène *goosecoïd*.



Le gène *goosecoïd* a été mis en évidence par De Robertis et coll. (1991) en utilisant des sondes contenant des homéoboîtes de la drosophile. Il doit son nom au fait que son homéoboîte présente des analogies avec celle de *bicoid*, qui établit la polarité céphalique chez les Insectes (voir § 3.5.4b) et avec celle de *gooseberry*, gène de polarité des segments (voir tableau 11.2). Ce gène a été très conservé au cours de l'évolution puisqu'on le retrouve aussi bien chez les Hydriaires que chez les Insectes et les Vertébrés.

Chez le xénope, *goosecoïd* est transcrit dès la fin du stade blastula dans la région du centre organisateur et ses produits s'accumulent dans les cellules au-dessus de la lèvre blastoporale.

Expérimentalement, son expression peut être induite par les produits des gènes *siamois* et *twin*. On a montré *in vitro* que la protéine Twin se lie au promoteur du gène *goosecoïd* (Laurent et coll., 1997) ; ce promoteur peut aussi être activé par des TGF- β (Watabe et coll., 1995). *In vitro*, *goosecoïd* est exprimé dans des calottes animales traitées par la protéine Vg1 ou par Nodal (voir 12.5.8). Des expériences similaires menées avec Noggin ou avec le FGF basique montrent que ces protéines inductrices sont sans effet sur l'activation de ce gène. D'autres gènes cités au § 15.3.1 agissent en synergie avec *goosecoïd* (voir encart 15.4)

Goosecoïd s'exprime aussi chez les autres embryons de Vertébrés comme la souris, le poisson-zèbre, l'embryon de poulet. Chez celui-ci, il est largement exprimé sur tout le disque embryonnaire de la blastula et, juste avant la gastrulation, son expression se restreint au centre organisateur c'est-à-dire le nœud de Hensen.

b) Expression de *goosecoïd* dans la zone marginale du centre organisateur

Dans ces divers exemples, les cellules où le gène *goosecoïd* est exprimé sont les cellules du centre organisateur qui migrent le plus avant sous le toit de l'archentéron,

c'est-à-dire les cellules du mésoderme précordal et de l'endoderme pharyngien ; elles seront inductrices des structures céphaliques. Des ARN-m *goosecoïd* injectés dans un groupe de blastomères stimulent d'ailleurs la migration des cellules qui proviennent de la division de ces blastomères vers la région antérieure de l'embryon, migration que réalisent normalement les cellules de la plaque précordale (Niehrs et coll., 1994). Ce gène pourrait être un élément déterminant de leur mécanique migratoire dans la région la plus antérieure.

Chez l'embryon de souris, la région du nœud située à l'avant de la ligne primitive est considérée comme l'homologue du centre organisateur des Amphibiens. Transplantée sur un embryon de poulet, cette région a la capacité d'induire du mésoderme axial. Ce pouvoir est supprimé si le gène *goosecoïd* a été neutralisé par « knock-out » (Zhu et coll., 1999).

Goosecoïd agit comme un répresseur de transcription qui inhibe l'expression de gènes ventraux dans la région de l'organisateur de Spemann.



ENCART 15.4 Autres gènes intervenant en collaboration avec *goosecoïd*

- Les gènes à homéoboîte *Xlim-1*, *Xanf-1* et *Xnot* s'expriment comme *goosecoïd*, en synthétisant des facteurs de transcription dans le territoire précordal. *Xanf-1* est exprimé très précocement à la gastrulation, dans les cellules migratrices de la lèvre blastoporale situées en profondeur. Ils induisent la formation d'axes secondaires incomplets quand ils sont surexprimés dans l'embryon.
- Le gène *Xnot* (von Dassow et coll., 1993), est un gène à homéoboîte qui s'exprime dans le mésoderme cordal et, plus tard, dans le plancher neural. Son expression est contrôlée par l'activine dans les blastomères dorsaux et par un FGF. La technique d'injection d'ARN-m codant pour des récepteurs au FGF tronqués de leur domaine tyrosine-kinase, supprime l'expression de ce gène. La surexpression de *Xnot* provoquée par l'injection d'un excès de son ARN-m dans la région dorsale conduit à un développement excessif de la corde.
- *XFKH-1* (Dirksen et coll., 1992) et *Pintavallis* (Ruiz et coll., 1992), d'abord exprimés dans les parties antérieures et moyennes de l'organisateur, se retrouvent surtout ensuite dans le mésoderme cordal, la protéine *Pintavallis* induisant la mise en place du tube neural.

c) Implication de *goosecoïd* dans l'organisation d'un axe dorsal

Si des transcrits *goosecoïd* sont injectés dans des blastomères ventraux d'un embryon au stade 4 cellules, un axe embryonnaire surnuméraire y est induit dans 75 % des cas. Un axe ventral surnuméraire est de même obtenu en injectant ces ARN-m au stade 32 cellules, dans un blastomère ventral de la région équatoriale ; on peut alors montrer que les cellules injectées participent à la formation mésodermique de cet axe et qu'elles peuvent induire la dorsalisation de cellules provenant d'autres blastomères ventraux (Niehrs et coll., 1993). En revanche, l'injection d'ARN-m *goosecoïd* dans lequel la séquence correspondant à l'homéodomaine a été supprimée est sans effet : la protéine synthétisée, n'ayant plus de site de liaison à l'ADN, n'est plus régulatrice d'une activité génique.

15.3.3 Rôle de la protéine Wnt8¹ dans la différenciation du mésoderme ventral

Wnt8 est une des protéines régulatrices de la différenciation du mésoderme ventral ; elle contribue également à limiter l'aire d'activité du centre organisateur de Spemann.

Les travaux de Nieuwkoop (§ 12.5.3) montrent que, dans l'association d'une calotte animale et de blastomères de l'endoderme ventral, ces derniers induisent la différenciation de mésoderme de type ventral dans la calotte. Il existe donc des gènes régulateurs pour l'expression de structures mésodermiques ventrales.

La protéine Wnt8 (voir § 11.1.2) est le produit d'un d'entre eux. Chez le xénope, elle est synthétisée dès la transition blastulénne et se trouve activée par les FGF. Son domaine d'expression est bien localisé. Elle est présente sur tout le pourtour de la zone marginale du mésoderme nouvellement induit, on ne la trouve ensuite que dans le mésoderme ventral. Elle est absente des territoires où *goosecoïd* s'exprime ; la présence simultanée des deux protéines n'est pas compatible. En effet, l'injection dans les blastomères ventraux de l'ARN-m *goosecoïd* inhibe l'expression de *Xwnt8*. À l'inverse, une injection dorsale de l'ARN-m de *Xwnt8* entraîne une synthèse ectopique de cette protéine à la gastrulation, dans les blastomères dorsaux, où ces gènes sont normalement réprimés. Ceci provoque des anomalies résultant de déficiences de la fonction de l'organisateur céphalique, c'est-à-dire de l'expression de *goosecoïd*, avec un mauvais développement du mésoderme céphalique et de la corde (Christian et coll., 1993).

Les protéines Wnt se lient sur leurs cellules cibles à des récepteurs membranaires protéiques, Frizzled. On a montré que la protéine soluble Frizbee (Frzb) sécrétée par laèvre dorsale du blastopore et dont la structure est proche de Frizzled, entre en compétition avec le récepteur Frizzled en se liant aux protéines Wnt (Leynes et coll., 1997). Ainsi dans la région dorsale, *Xwnt8*, en se liant à Frzb et non à son récepteur Frizzled, ne peut pas exercer son action inhibitrice sur le développement d'un mésoderme axial (De Robertis, 1997 ; Moos, 1997).

D'autres gènes à homéoboîte, exprimés dans le mésoderme ventral et ventrolatéral semblent aussi entrer en compétition avec *goosecoïd*, comme *Xvent-1* et *Xvent-2*, activés par BMP4.

15.3.4 Rôle du gène *Brachyury*² dans la différenciation du mésoderme

Ce gène est exprimé dans l'ensemble du mésoderme et joue un rôle important dans sa différenciation.

Brachyury est activé par l'activine et le FGF β et par de faibles concentrations de Vgl *in vitro*. Il a des homologues chez les autres Vertébrés.

1. *Xwnt8* chez le xénope.
2. *XBra* chez le xénope.

Avant la gastrulation, il s'exprime dans la région de la lèvre blastoporale de la blastula âgée de xénope et dans son équivalent chez le poisson-zèbre. Au début de la gastrulation, ce gène s'exprime à la fois dans le centre organisateur et dans du mésoderme situé plus latéralement. Après la gastrulation, son expression se restreint à la corde et aux cellules qui développeront le bourgeon de la queue.

L'injection d'ARN-m de XBra en position ectopique dans la blastula de xénope provoque la différenciation de formations mésodermiques dans l'ectoderme (Cunliffe et coll., 1992). Chez des souris mutantes homozygotes T/T chez qui ce gène ne fonctionne pas, la formation de la ligne primitive est perturbée (Camus et coll., 1993). Chez les mutants homozygotes du poisson-zèbre présentant une délétion de ce gène (mutation *ntl* pour « *no tail* »), il est montré que la capacité inductrice de la corde et des somites est réduite, malgré des mouvements morphogénétiques corrects (Halpern et coll., 1993). Cependant, chez le xénope, il ne peut induire, à lui seul, la différenciation de la corde (O'Reilly et coll., 1995).



Chez les Oiseaux, la topographie moléculaire du nœud de Hensen, homologue de la lèvre dorsale du blastopore, est aussi bien établie que celle du centre organisateur des Amphibiens. Il présente une hétérogénéité avec des différences dans l'expression des gènes organisateurs et dans les capacités morphogénétiques de trois régions, antérieure, moyenne et postérieure qui ont leurs fonctions propres dans la différenciation de la partie postérieure de l'embryon.

15.4 SÉCRÉTION DES PROTÉINES INDUCTRICES DE STRUCTURES DORSALES PAR LE CENTRE ORGANISATEUR DE SPEMANN ET MANGOLD

15.4.1 Les protéines Noggin, chordin et la follistatine

Nous avons vu que ces protéines sont synthétisées dans le mésoderme dorsal de la blastula âgée sous l'action de protéines régulatrices comme Goosecoïd (fig. 12.11), elles neutralisent l'ectoderme dorsal qui se trouve au-dessus du mésoderme cordal lors de la gastrulation. En position ectopique, elles induisent la formation d'axes secondaires, avec des structures antérieures incomplètes. Les signaux inducteurs sont transmis verticalement (fig. 15.3). Ces protéines sont des antagonistes des protéines BMP inductrices d'épiderme auxquelles elles se lient, empêchant leur liaison avec leur récepteur et laissant ainsi la voie à la différenciation neurale.

a) La protéine Noggin (Smith et Harland, 1991 et 1992)

Elle est déjà présente à un faible niveau dans l'ovocyte. Elle est ensuite synthétisée par le génome embryonnaire dans le mésoderme dorsal de la blastula âgée, dans le centre organisateur de Spemann de la jeune gastrula et finalement dans ses dérivés, le mésenchyme céphalique et la corde. Elle est sécrétée vers des tissus cibles.

On a montré, chez la souris, qu'elle est sécrétée par les cellules de la région nodale qui forment le mésoderme précordial et participent à la formation de la tête.

15 • Inductions embryonnaires pendant la gastrulation et la morphogénèse

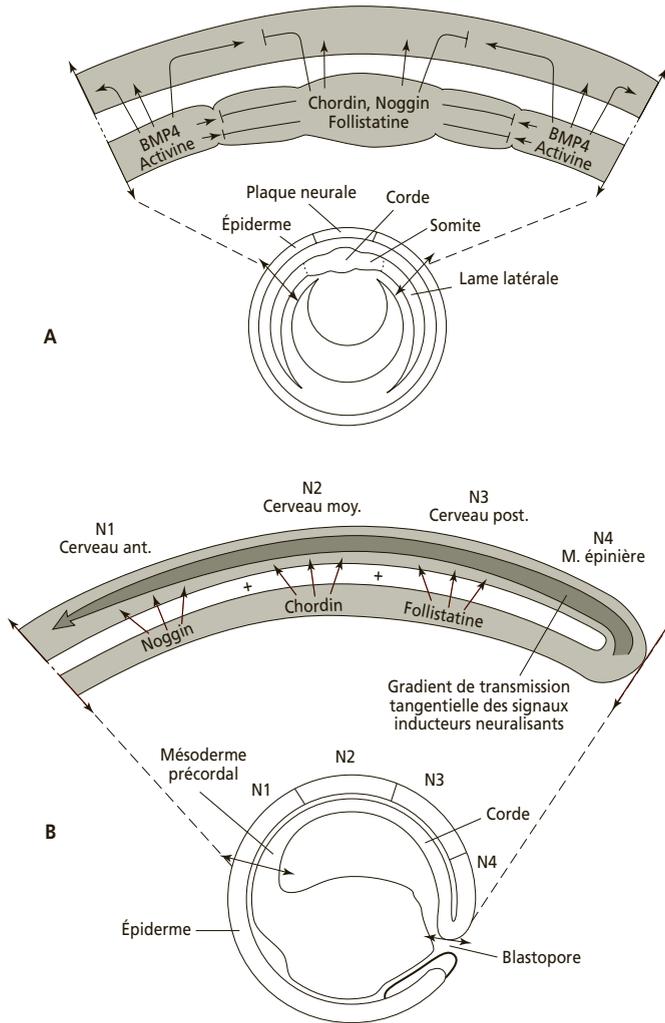


Figure 15.3 - Transmission des signaux d'induction neurale et d'induction épidermique pendant la gastrulation.

A : Coupe transversale de gastrula âgée et détail des inductions émises vers l'ectoderme. Les protéines inductrices neuralisantes (chordin, Noggin et follistatine) sont sécrétées vers l'épiderme depuis le mésoderme axial antérieur (O1 à O4 de la Fig. 12.8) ; elles limitent le champ d'action de BMP4 et lèvent l'inhibition de la différenciation neurale. Des protéines inductrices ventralisantes, essentiellement BMP4 et des activines, induisent la différenciation épidermique et inhibent la différenciation neurale.

B : Coupe sagittale de gastrula âgée schématisant un mode possible de transmission de facteurs de régionalisation. Des facteurs émis par la lèvre dorsale du blastopore seraient transmis horizontalement à travers le tissu neural, suivant un gradient décroissant ; ce sont l'acide rétinoïque, une protéine Wnt, des FGF ; ils y induiraient une régionalisation antéro-postérieure, le degré de céphalisation est inversement proportionnel à la concentration de ces inducteurs, qui est symbolisée par une flèche d'épaisseur décroissante.

- *Noggin dorsalise le mésoderme*

Lorsqu'elle est injectée dans un blastomère végétatif ventral, cette protéine induit des formations dorsales dans les blastomères animaux voisins. Sur des embryons irradiés aux UV, son injection restaure des structures dorsales complètes. Si du mésoderme latéral présomptif est isolé et cultivé en présence de Noggin, de l'ARN-m d'actine musculaire y est transcrit et les explants s'allongent, comme le feraient les zones latérales dorsales mais il ne se forme pas de corde.

- *Noggin agit en neutralisant les protéines BMP4 et BMP2, facteurs ventralisants* (De Robertis et Sasai, 1996) (fig. 12.11 et 15.3). La dorsalisation de l'explant observée dans l'expérience précédente est interprétée de la manière suivante : dans les conditions naturelles, les tissus du mésoderme sont destinés, sous l'action de BMP4, à former des structures ventrales comme du mésenchyme et des cellules sanguines. Noggin qui diffuse latéralement dans le mésoderme depuis le centre organisateur, neutralise la protéine BMP4 en s'y liant de telle façon qu'elle ne puisse plus se combiner à ses récepteurs, et ceci avec une efficacité d'autant plus grande qu'on se rapproche de l'axe embryonnaire. Noggin organiserait donc le patron de l'embryon en interrompant le signal de BMP4; si l'on injecte de l'ARN-m de BMP4 dans des œufs non segmentés de xénope, on provoque un excès de synthèse de la molécule et une différenciation généralisée du mésoderme en structures ventro-latérales. Dans de jeunes embryons, l'ARN-m de BMP4 supprime la formation des cellules de type dorsal et antérieur. L'action ventralisante de BMP4 sur le mésoderme se poursuit pendant la gastrulation.

- *Noggin intervient dans la neuralisation*

En effet, elle induit la synthèse de protéines neurales dans les tissus ectodermiques de xénope (Smith et coll., 1992 et 1993). Lorsqu'une calotte de l'hémisphère animal de blastula âgée est cultivée en présence de cette protéine, les cellules synthétisent des protéines spécifiques du tissu nerveux (N-CAM, β -tubuline neurale) sans exprimer l'actine musculaire. En revanche, lorsque cette calotte est cultivée en présence d'activine, les cellules expriment les mêmes protéines, plus l'actine musculaire.

Dans le premier cas, il y a eu induction directe de synthèses propres au tissu nerveux, dans le second cas, il y a également induction de protéines du tissu mésodermique musculaire.

Des expériences analogues avec des tissus ectodermiques de différents âges montrent que cette capacité inductrice neurale de Noggin reste forte, alors qu'aux mêmes stades, les potentialités inductrices de mésoderme par l'activine diminuent.

Si le gène *noggin* est injecté au pôle animal d'un œuf fécondé, au moyen d'un plasmide, de telle façon qu'il ne transcrive d'ARN-m qu'au début de la gastrulation, on constate que les calottes animales isolées à la blastula exprimeront plus tard, à un âge correspondant au bourgeon caudal, une protéine neurale, la N-CAM, sans aucune protéine de type musculaire.

b) La protéine chordin

C'est une protéine possédant des domaines riches en cystéine dont la synthèse est activée par des facteurs de transcription, Goosecoïd et Xnot-2 (fig. 12.11). Elle

apparaît peu avant la gastrulation, dans la zone marginale dorsale. On la trouve ensuite dans la plaque précordale et dans la corde jusque dans la région caudale (fig.15.3). Si cette protéine est injectée dans une blastula en position ventrale, il se forme un axe dorsal secondaire et du mésoderme para - axial. L'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre les ARN-m *chordin* empêche totalement la différenciation du système nerveux central de xénope (Oelgeschläger et coll., 2003). **Chordin, comme Noggin, neutralise les protéines BMP en s'y liant par ses domaines riches en cystéine.**

c) La follistatine

Cette protéine a d'abord été identifiée chez les Mammifères. Chez le xénope, l'ARN-m de la follistatine est présent dans l'œuf. Lors de la rotation de symétrisation, elle s'accumule dans la région marginale dorsale. Au moment de la gastrulation, la follistatine est sécrétée par le mésoderme dorsal ; le mésoderme axial sécrète de la follistatine pendant qu'il s'invagine sous l'ectoderme et celle-ci se trouve finalement localisée dans la corde (Hemmanti-Brivanlou et coll., 1994). L'incubation de tissu ectodermique en sa présence induit la synthèse de molécules caractéristiques du tissu neural.

La follistatine permet la neuralisation de l'ectoderme dorsal, en inhibant indirectement l'action inductrice de l'activine suivant un mécanisme différent de Noggin et de chordin (fig. 15.3).

On a d'abord pensé que la follistatine se liait à l'activine présente dans le mésoderme et neutralisait ainsi son activité inductrice en l'empêchant de se lier à son récepteur. L'activine ne pouvait alors jouer son rôle qui est d'orienter les cellules ectodermiques vers une différenciation épidermique; elles se différenciaient alors spontanément en des tissus neuraux.

On a proposé depuis d'autres interprétations du mode d'action de la follistatine. Elle inhiberait la ventralisation du mésoderme de façon indirecte, en se liant à BMP7, proche de l'activine qui est elle-même nécessaire à l'activation de BMP4 ; elle participerait donc à l'induction du mésoderme dorsal en empêchant l'action ventralisante de BMP4 (Yasumashida et coll., 1995). Pour d'autres, elle formerait un complexe avec BMP4 pour laquelle elle présente une affinité *in vitro*. Ce complexe, en se liant aux récepteurs de BMP, neutraliserait l'action de BMP4.

La conception que les trois inducteurs (Noggin, chordin et follistatine) agissent en exerçant une activité sur un répresseur paraît logique si l'on pense que la plupart des gènes d'une cellule sont réprimés et que, pour permettre l'expression de caractères particuliers, c'est-à-dire une différenciation, il faut que l'inhibition des gènes codant pour ces caractères soit levée ; l'inducteur doit donc être un inhibiteur de leur répresseur ; son action est nécessaire pour que le caractère soit «induit». Nous retrouverons cette notion avec l'étude des inductions neurale et épidermique (voir § 15.5).

15.4.2 Les différenciations régionales au sein des grands axes dépendent d'autres inducteurs élaborés dans le centre organisateur de Spemann et Mangold

a) Rôle de gènes de la famille Nodal (Xnr) dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur

Xnr-1 et *Xnr-2* sont exprimés dans l'endomésoderme antérieur, ainsi que dans le mésoderme précordial et participent à la formation de l'axe dorsal. Ces facteurs peuvent induire l'expression de protéines propres à l'endomésoderme antérieur, mais la surexpression de gènes mutants de *Xnr-2* entraîne des anomalies dans les formations céphaliques antérieures qui sont alors tronquées. D'autre part, alors que Noggin seule induit une différenciation axiale incomplète, sa co-expression avec le produit de *Xnr-1* entraîne la formation d'un axe complet (Osada et Wright, 1999). L'expression des gènes *Xnr* peut être activée par des facteurs maternels (Vgl, VegT).

b) Cerberus induit la formation de structures très antérieures

Cette protéine de l'organisateur de Spemann joue un rôle cantonné à l'induction de régions antérieures du cerveau et en outre de placodes sensorielles, ce que ne font pas les inducteurs précédemment décrits. Par ailleurs, elle n'induit pas de différenciation dorsale du mésoderme, mais des structures ventrales, comme le cœur et le foie.

C'est une protéine sécrétée dont l'ARN-m est détecté au moment de la gastrulation dans la région dorsale de l'embryon, dans les cellules migratrices les plus antérieures de l'endoderme pharyngien et du mésoderme céphalique (De Robertis et coll., 1996). La synthèse de la protéine Cerberus est activée par chordin, la follistatine et Noggin et ne s'exprime que dans les mêmes territoires qu'eux. C'est un inducteur de structures très antérieures de la tête.



– Si l'on injecte des ARN-m *cerberus* dans un blastomère ventral de jeune blastula au stade 32 cellules, on obtient un embryon à deux têtes ; c'est d'ailleurs ce résultat qui a valu son nom¹ à la protéine. Il ne s'y forme pas de structures mésodermiques dorsales, comme de la corde ou des somites.

– *In vitro*, la protéine Cerberus induit la formation de structures céphaliques antérieures dans des cellules provenant de la zone marginale ventrale.

– Dans un embryon traité aux UV de telle façon que la gastrula soit atypique, l'injection d'ARN-m *cerberus* restaure uniquement la formation de structures de type antérieur, avec œil, placodes olfactives ; il ne se différencie pas de structure troncale.

Cerberus agirait dans l'endomésoderme en se liant, par des sites différents, aux facteurs de croissance ventralisants, comme *Xnr-1*, les BMP, et *XWnt8*, ce qui a pour effet de les neutraliser. Ainsi, une forme tronquée qui ne conserve que son site de liaison à Nodal n'inhibe que le signal Nodal (*Xnr*). La présence de Cerberus dans

1. Cerbère est le nom du chien gardien de la porte des Enfers dans la mythologie grecque ; il avait... trois têtes, et non deux !

l'endomésoderme délimite donc une aire dépourvue des protéines Nodal, BMP et XWnt8. L'inhibition simultanée de ces trois facteurs serait nécessaire au développement d'une tête (Piccolo et coll., 1999).

c) Dickkopf et Frizbee (protéine Frzb)

D'autres antagonistes de facteurs de croissance ventraux sont aussi exprimés dans l'endomésoderme antérieur, le mésoderme précordal et le cordonmésoderme antérieur. Dickkopf neutralise Wnt en se fixant sur son récepteur (Glimka et coll., 1998). Wnt8 est également neutralisé par la protéine soluble Frizbee (voir § 15.3.3).

d) L'acide rétinoïque favorise le développement de structures postérieures et diffuse tangentiellement dans l'ectoderme

L'acide rétinoïque a été identifié au niveau du centre organisateur (lèvre blastoporale et nœud de Hensen) et, à des stades ultérieurs, au niveau des ébauches de membres par exemple (voir § 11.3.4d). Lors de la gastrulation, il participe à la détermination de l'axe antéro-postérieur. En effet, des embryons subissant un traitement de courte durée avec de l'acide rétinoïque à ce stade du développement présentent des anomalies aussi bien au niveau de la plaque neurale que du mésoderme axial. On constate aussi que, dans la formation des membres, des concentrations anormales perturbent l'expression des gènes Hox. Ses effets seraient fonction de sa concentration qui varie dans le centre organisateur pendant la gastrulation. Dans le mésoderme dorsal de la jeune neurula de xénope, elle est d'ailleurs 10 fois plus élevée que dans le mésoderme précordal. Une quantité variable d'acide rétinoïque pénètre dans les cellules axiales pendant l'induction, suivant leur position le long de l'axe antéro-postérieur, ce qui activerait indirectement par l'intermédiaire de produits de la famille de gènes Cdx (gènes homologues de *caudal* de la drosophile), des gènes régulateurs homéotiques différents (fig. 11.5 et 11.7).

L'acide rétinoïque favorise le développement de structures neurales du tronc au détriment du cerveau antérieur ; il agit aussi bien sur le mésoderme antérieur qu'il rend inapte à induire du cerveau antérieur, que sur l'ectoderme qui devient incompetent pour former du cerveau antérieur. La sensibilité des gènes Hox est en relation avec leur position ; elle va en décroissant de l'extrémité 3' de la molécule d'ADN vers l'extrémité 5'. Ces derniers s'expriment plus tardivement et dans la région postérieure de l'embryon. L'administration précoce à l'embryon d'un excès d'acide rétinoïque stimulera donc les gènes Hox dans des régions plus antérieures à celles de leur niveau d'expression normale.

e) Sonic hedgehog intervient dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale du tube neural

Cette protéine régulatrice se manifeste plus tardivement dans la suite des inductions de la gastrulation. Nous savons qu'elle est un des homologues de la protéine régulatrice Hedgehog qui contribue à la définition des parasegments dans l'embryon de drosophile (voir tableau 11.2).

Sonic hedgehog est sécrétée par la corde et le mésoderme précordial chez les embryons de xénope, de poulet et de souris. Elle agit suivant un gradient décroissant ventro-dorsal et induit d'abord l'expression de son propre gène dans le plancher du tube neural. Elle joue ensuite un rôle organisateur de la polarité dorso-ventrale du tube neural en induisant la différenciation du plancher de celui-ci et la différenciation des neurones moteurs à partir de ses cellules ventro-latérales, en collaboration avec d'autres facteurs comme Noggin, inhibiteur de BMP. Sonic hedgehog réprime d'autre part l'expression de gènes propres à l'aire dorsale (*dorsalin*, *Pax3*, *Pax6*, *Pax7*, etc.)

La différenciation de la région dorsale (ou tectale) du tube neural, d'où se sont séparées les crêtes neurales, est indépendante des signaux émis par la corde et notamment de Sonic hedgehog. En effet, après ablation expérimentale de la corde, des marqueurs normalement présents dans la partie dorsale, comme *Pax3*, s'expriment dans l'ensemble du tube neural. La différenciation dorsale du tube est sous le contrôle de protéines Wnt et de TGF- β , notamment BMP4, BMP5, BMP7, qui sont synthétisées dans l'épiderme dorsal, de part et d'autre de la gouttière neurale puis, après la fermeture du tube neural, dans le toit de celui-ci. Ces protéines se répartissent dans le tube neural suivant un gradient dorso-ventral contrariant les effets de Sonic hedgehog et induisent l'expression des gènes propres à l'aire dorsale ; c'est dans cette aire que, plus tard, se différencient les neurones sensoriels.

Sonic hedgehog est aussi un inducteur des sclérotomes et des somites et intervient à d'autres étapes du développement dans différentes organogenèses, comme celle des membres (voir § 11.3.4c).

15.5 L'INDUCTION DU SYSTÈME NERVEUX ET DE L'ÉPIDERME

L'hypothèse suivant laquelle, depuis longtemps, les embryologistes considèrent que l'induction du système nerveux est le résultat d'une induction en deux temps à partir du mésoderme axial (Saxen et Toivonen, 1955, voir encart 15.5) est confirmée par les résultats récents.

Par ailleurs, le restant de l'ectoderme est le site d'une induction épidermique qui se trouve en compétition avec l'induction neurale.

15.5.1 Signaux neuralisants, céphaliques et postérieurs (fig. 15.3)

La formation de la plaque neurale, puis du tube neural est le résultat d'inductions émises pendant la gastrulation par le centre organisateur de Spemann qui s'invagine sous l'ectoderme.

– **Un premier signal** qui correspond à une activation neuralisante de l'ectoderme dorsal est transmis à partir du mésoderme ; il induit la différenciation de formations antérieures de type prosencéphale. Les protéines Noggin, chordin, follistatine et Cerberus sont directement impliquées dans ce signal. Ainsi, lorsque de



ENCART 15.5 L'induction neurale : des signaux multiples qui n'agissent pas simultanément

Il est souvent nécessaire que plusieurs sources d'inducteurs soient présentes simultanément ou successivement pour provoquer une induction.

Toivonen et Saxen (1955) montrent que la formation du système nerveux axial au cours de l'induction neurale, nécessite l'action coordonnée de deux inducteurs.

Ils implantent simultanément dans le blastocèle d'une jeune gastrula des inducteurs hétérogènes de structures de cerveau antérieur (foie de cobaye) et de structures mésodermiques (moelle osseuse). Dans ce cas, non seulement ces deux types de formations vont se développer, mais il se forme en outre du cerveau moyen et postérieur ainsi que de la moelle épinière que chaque implant isolé était incapable d'induire. Suivant la quantité relative des différents inducteurs, chaque partie du système nerveux sera plus ou moins développée.

Ce modèle à deux inducteurs qui se dégageait de ces expériences fut précisé par Saxen et coll. (1964) qui montrèrent la dimension chronologique du phénomène par des expériences d'association entre de l'ectoderme compétent avec l'un ou l'autre de ces deux inducteurs dans des cultures en «sandwich». Si, après 24 heures d'induction, chaque lot de cellules ectodermiques est dissocié, celles-ci se réagrègent et forment les structures prévisibles, cerveau antérieur ou moelle épinière. Si les deux catégories de cellules ectodermiques déjà induites sont mélangées et cultivées en agrégat, il se forme en outre du cerveau moyen. Sa différenciation a été déterminée dans une seconde étape, au moment de la recombinaison de deux types de cellules, après la période initiale d'induction neurale déjà signalée et avant qu'une différenciation régionale du système nerveux soit stabilisée.

L'ectoderme dorsal de jeune gastrula est prélevé avant la migration du mésoderme puis cultivé en présence de l'une de ces protéines, il n'apparaît que des marqueurs de structures antérieures.

– **Un second signal** caudalisant est transmis depuis la lèvre blastoporale, au sein de l'ectoderme dorsal permettant la formation des structures plus postérieures le long de l'axe céphalo-caudal. Les protéines Wnt et notamment Xwnt8 seraient des agents essentiels de la différenciation des structures postérieures du tube neural (Domingos et coll., 2001). Wnt et la β -caténine se distribuent dans la plaque neurale présomptive de la jeune gastrula suivant des gradients décroissants postéro-antérieurs. Si l'action de Wnt est amplifiée chez la jeune gastrula par l'injection de plasmides contenant les gènes *Wnt8*, les marqueurs de différenciation du tube neural seront plus antérieurs que la normale. A l'inverse, si Wnt est neutralisé à l'aide de Frizbee, cerberus ou de Dickkopf (voir § 15.4.2b-c), les marqueurs de différenciation céphalique seront présents dans des régions plus postérieures. Il existe d'autres facteurs caudalisants ; ainsi, nous avons vu le rôle possible de l'acide rétinoïque (voir § 15.4.2d). Par ailleurs, des FGF rendraient pour leur part les cellules sensibles à l'action des Wnt. Il y a diverses hypothèses quant aux modes de transmission de ces facteurs caudalisants ; l'une d'elles, faisant intervenir un mode de transmission tangentielle, est illustrée par la figure 15.3.

15.5.2 Induction de l'épiderme et différenciation neurale

– Une induction transmise par les protéines BMP dont BMP4 est nécessaire pour que les cellules ectodermiques se différencient en épiderme ; les inducteurs neuraux sont des inhibiteurs de cette induction (fig. 15.3). Selon ce modèle, les BMP sont des inducteurs de l'épiderme qui inhiberaient la différenciation neurale. Cette inhibition est levée par les molécules antagonistes de BMP4 ; c'est ce qui a été appelé une **différenciation neurale par défaut**. Les mécanismes moléculaires intervenant dans l'induction neurale se révèlent très conservés au cours de l'évolution (voir encart 15.6).



Universalité des gènes impliqués dans les différenciations neurale et épidermique

Chez les Mammifères, l'ectoderme se partage en épiderme et en tube nerveux sous l'action d'inducteurs issus du mésoderme qui, par un jeu de neutralisations réciproques tracent les limites de l'ébauche neurale. Chez tous les Métazoaires, les tissus nerveux et épidermiques ont une même origine et les mécanismes qui orientent l'ectoderme vers l'une ou l'autre voie sont identiques. Les protéines inductrices de l'épiderme et du système nerveux que nous avons étudiées chez le xénope possèdent leurs homologues jouant le même rôle chez la drosophile. Par exemple, la protéine Sog est l'homologue de chordin, et Decapentaplegic (Ddp) celui de BMP4. Les ARN-m de protéines de xénope peuvent être injectés à l'embryon de la drosophile ou inversement. Elles interviennent de la même manière dans l'induction du système nerveux : Sog ou chordin bloquent les effets de Ddp ou de BMP4. La répartition relative de ces protéines antagonistes est inversée chez l'embryon de drosophile, chez qui le système nerveux est ventral comme chez tous les Insectes, par rapport à celle du xénope et des autres Vertébrés, chez qui le système nerveux est dorsal. Il apparaît ainsi que les mécanismes d'induction du système nerveux sont conservés depuis près de 600 millions d'années.

Ces observations confortent l'hypothèse de Geoffroy Saint-Hilaire vigoureusement contestée à son époque (1822), suivant laquelle le modèle d'organisation des Vertébrés à système nerveux dorsal, ou épineuriens, était le même que celui des Invertébrés à chaîne nerveuse ventrale, ou hyponeuriens, il suffit de retourner l'un de 180° pour obtenir l'autre.

D'après les expériences d'embryologie classique, et notamment les expériences de Spemann, l'ectoderme forme de l'épiderme en l'absence de toute induction et du système nerveux en présence des inducteurs neuralisants, cette aptitude disparaissant à la fin de la gastrulation, quand la compétence neurale de l'ectoderme disparaît.

On ne peut, avec l'interprétation classique de l'induction neurale, expliquer certains résultats comme ceux de Grunz et coll. (1989), Duprat (1989) et d'autres auteurs, qui obtiennent, au bout de plusieurs heures, des différenciations de type neural dans des cultures *in vitro* de calottes ectodermiques de blastula si leurs

cellules sont dissociées en l'absence de calcium. Il n'y a aucun tissu mésodermique dans les cultures qui puisse être inducteur ; on est donc amené à considérer que l'ectoderme avait une compétence latente à former du tissu nerveux qui s'est exprimée grâce à la dissociation qui aurait dilué un inducteur épidermique et levé l'inhibition que les cellules de l'ectoderme exerçaient les unes sur les autres. Si BMP4 est ajouté dans ces cultures de cellules dissociées, celles-ci expriment par contre des marqueurs épidermiques caractéristiques, comme de la cytokératine (Wilson et Hemmati-Brivanlou, 1995). Des expériences visant à neutraliser l'action de BMP4 ont toujours abouti à une neuralisation de l'ectoderme ; **en aucun cas la différenciation de l'épiderme n'est spontanée.**

En revanche, la culture de la même calotte animale non dissociée jusqu'au stade neurula ne donne que de l'épiderme. Si, avant de prélever cette calotte, on injecte dans la jeune blastula, des ARN-m codant pour un récepteur tronqué de BMP4, les cellules dans cette calotte en culture sont devenues insensibles à l'action de BMP4 et se différencient en neurones.

Dans les conditions d'un développement normal, des mécanismes doivent intervenir dans l'aire dorsale pour neutraliser soit la synthèse ou la stabilité des BMP, soit la transmission, au niveau de leurs récepteurs par exemple, de l'information dont ils sont porteurs. C'est ainsi que l'ARN-m de BMP4 disparaît graduellement de l'ectoderme dorsal au début de la gastrulation (Hemmati-Brivanlou, 1995), mais on ne connaît pas les mécanismes qui régulent sa synthèse. On a montré d'autre part que les protéines Noggin, chordin, la follistatine, Xnr et Cerberus qui sont synthétisées dans l'organisateur de Spemann et induisent l'expression de molécules spécifiques du tissu nerveux, comme la N-CAM dans des calottes animales en culture, inhibent l'activité de BMP4 (Sasai et coll., 1996) (voir § 15.4.1).

Un signal Wnt serait également nécessaire au cours de la segmentation pour préparer l'ectoderme dorsal en supprimant le signal BMP dans la région dorsale ; ce futur ectoderme neural serait ainsi sensibilisé pour répondre à des signaux neuralisants (Baker et coll., 1999).

- **Le rôle de BMP4 dans la différenciation épidermique est donc bien établi.** Il existe un gradient de concentration dégressive ventro-dorsal de BMP, les doses élevées induisant la différenciation de kératine épidermique puis de glandes cémentaires. Outre leur implication dans la répression de gènes impliqués dans la formation du tissu neural tel *neurogenin*, les BMP activent des gènes cibles responsables de la différenciation épidermique. Ainsi *msx1* et *msx2* codant pour des facteurs de transcription à homéodomaine sont des gènes cibles possibles pour BMP4 (Suzuki et coll., 1997) ; *msx1* est exprimé rapidement en réponse à une induction par BMP4 et se détecte dans l'ectoderme ventral et dans le mésoderme. Sa surexpression dans de l'ectoderme dissocié entraîne l'apparition de cellules épidermiques alors que normalement, elles donneraient des cellules nerveuses. L'interaction de BMP4 ou de BMP2 avec les gènes *msx* est aussi observée dans des ébauches comprenant de l'épiderme et du mésenchyme, comme c'est le cas des follicules pileux, des plumes et des dents. Ce mécanisme pourrait également intervenir dans la différenciation d'éléments du squelette issus des crêtes neurales.

15.5.3 Détermination du territoire des crêtes neurales

Situées entre l'épiderme et le territoire neurodermique à l'origine du système nerveux central, les crêtes neurales sont des formations propres aux Vertébrés (voir § 8.5.1 c).

Elles s'isolent du tube nerveux au moment de la neurulation. Leur territoire a été induit par des facteurs BMP et Wnt6 qui sont émis par le mésoderme para-axial au moment de la fermeture du tube neural et sont présents à une forte concentration dans l'épiderme. Ceux-ci induisent à leur tour notamment la synthèse de facteurs de transcription tels FoxD3 et Slug. FoxD3 est indispensable à la différenciation du territoire neurectodermique en crêtes neurales ; s'il est neutralisé, les crêtes ne se forment pas; Slug paraît quant à lui nécessaire à la transition épithélio-mésenchymateuse permettant aux cellules de quitter la structure épithéliale et de pouvoir migrer. Les facteurs Wnt et BMP conditionnent également la nature des différentes catégories de dérivés des crêtes neurales.

15.6 FORMATION DES SOMITES CHEZ LES VERTÉBRÉS

Le mésoderme axial qui forme la corde et le mésoderme para-axial, à l'origine des somites, sont dorsalisés pendant la gastrulation sous l'effet inducteur de Noggin notamment, qui neutralise la protéine ventralisante BMP4 (voir § 15.4. 1b).

Dans la région troncale du mésoderme para-axial, les somites se différencient de part et d'autre de la corde. Les cellules des lames du mésoderme présomitique, jusqu'alors mésenchymateuses, s'agencent en cordons spirales désignés sous le terme de **somitomères**. Ceux-ci se condensent et constituent des somites immatures qui présentent à leur périphérie une structure épithéliale les isolant du matériel présomitique initial. Une fragmentation progressive du mésoderme présomitique en blocs réguliers s'effectue ainsi, d'avant en arrière, donnant naissance à de nouvelles paires de somites. Ce processus se réalise selon une périodicité propre à chaque espèce mais aussi dépendante de conditions externes du développement comme la température.

C'est sur l'embryon d'oiseau qu'il est le plus aisé d'observer l'apparition des somites et d'expérimenter. Chez l'embryon de poulet, les somitomères se forment de façon régulière à partir de la 20^e heure d'incubation avec une période d'une paire environ toutes les 90 minutes à 37°C. Il s'en forme 50 paires chez cette espèce.

15.6.1 Mécanismes de la somitogenèse : l'horloge de segmentation du mésoderme somitique et la voie Notch

a) Transformation des relations intercellulaires

Avant que ne débute l'individualisation des somitomères, les relations intercellulaires se modifient dans les zones où se dessine une limite entre deux somites en formation. On assiste au passage de la structure mésenchymateuse à la structure épithéliale qui est à l'origine de la couche externe des somitomères. Ce phénomène est dû d'une part à une réorganisation de la matrice extra-cellulaire, avec notamment une synthèse de fibronectine, et d'autre part à des processus d'adhésivité et de répulsion intercellulaires. Ces derniers sont associés à l'expression de N-cadhérine et de

molécules du système Ephrines/Eph à la surface des cellules (voir § 11.1.2f). La synthèse de ces molécules membranaires est régulée par les produits des gènes s'exprimant dans la région antérieure du mésoderme présomitique (*Paraxis* et *Mesp2/c-Meso1*, voir *infra*), cependant que des liaisons entre la fibronectine matricielle et les intégrines membranaires induisent une réorganisation du cytosquelette microfilamentaire à l'origine des changements des morphologies cellulaires.

Une partie des transformations dans les relations intercellulaires qui permettent l'épithélialisation d'une ébauche somitique et sa séparation d'avec le mésoderme présomitique fait intervenir des voies de signalisation bien conservées au cours de l'évolution telle la voie Notch (voir §11.1.2f).

b) La voie Notch est activée de manière périodique et régule l'expression de gènes cycliques dans le mésoderme présomitique

● *Les gènes Notch sont activés de manière périodique dans le mésoderme présomitique.* Leurs ARN-m sont exprimés suivant des vagues de transcription qui se propagent chez l'embryon dans le sens cranio-caudal ; une vague de transcriptions d'ARN-m de Notch précède la délimitation antérieure de chaque nouvelle paire de somites. Les protéines réceptrices Notch nouvellement synthétisées se mettent en place et fonctionnent suivant les modalités décrites au § 11.1.2f. Il en résulte l'activation de gènes cibles qui modifient les rapports cellulaires. Leurs produits contribuent à réorganiser les cellules mésenchymateuses en épithélium, à dessiner la limite antérieure d'un somite et à rompre les liaisons intercellulaires avec le mésoderme insegmenté. En effet, si des cellules appartenant à la limite antérieure présomptive de futurs somites sont transplantées dans un territoire mésodermique qui n'est pas encore destiné à se segmenter, une nouvelle frontière va cependant se constituer avec la formation d'un épithélium, la voie de signalisation Notch ayant déjà été activée avant la transplantation.

● *La périodicité, suivant laquelle la voie Notch est activée et où se dessinera la limite antérieure d'un somite, est déterminée par le fonctionnement d'une « horloge biologique ».* Parmi les gènes cibles activés par le signal Notch, l'un d'eux, *Lunatic-fringe (Lfng)*, code pour une glycosyl-transférase qui module l'affinité de Notch pour ses ligands, Delta ou Serrate. Elle est ainsi capable d'établir un rétro-contrôle négatif sur la voie Notch. A chaque fois que Lunatic-fringe est dégradée, l'activité de Notch reprend, suivie d'un nouveau cycle de synthèse de Lunatic-fringe. Un tel système proposé pour l'embryon de poulet constituerait une base moléculaire pour expliquer la périodicité de la segmentation (Dale et coll., 2003).

● *Le signal Notch active un ensemble de gènes impliqués dans l'individuation des somites.* Des gènes autres que *Lunatic-fringe* sont également régulés par la voie Notch et s'expriment donc de façon périodique. C'est le cas de *c-hairy1* chez le poulet.

c-hairy1 est l'homologue d'un gène de segmentation « pair-rule » de la drosophile (voir § 11.2.3b), qui code pour un facteur de transcription de type b-HLH, et de façon plus générale des gènes codant pour des facteurs de transcription de la famille HES (pour "Hairy and Enhancer of Split").

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

La zone d'expression de *hairy1* se situe dans la partie postérieure de l'embryon, dans le mésoderme para-axial insegmenté (fig. 15.4). *Hairy* s'y exprime par vagues avant la formation de chaque paire de somites, pour se restreindre finalement à la moitié postérieure de ces somites à venir. Dès qu'une paire est individualisée, une nouvelle vague d'expression de *hairy1* apparaît dans le mésoderme para-axial pour se restreindre 90 minutes plus tard à la zone caudale de la paire de somites suivants. Il s'écoule 90 minutes entre la formation de deux paires successives de somites chez le poulet. Le gène *hairy1* continue à s'exprimer dans la région postérieure de chaque somite pendant une quinzaine d'heures après sa formation.

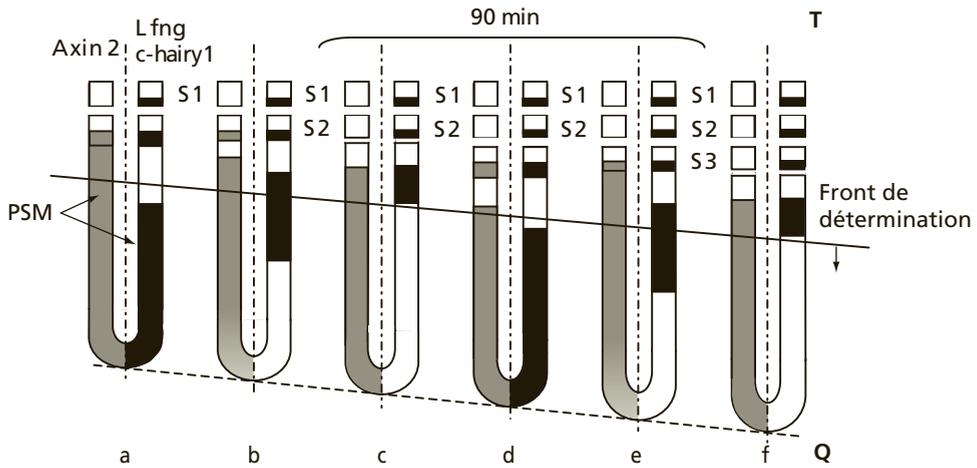


Figure 15.4 - Expression des gènes cycliques et individualisation des somites.

(Schéma intégrant des données concernant le poulet et la souris).

La figure représente de façon schématique la partie postérieure de l'aire embryonnaire d'un embryon de poulet, de part et d'autre de la corde.

Chaque apparition d'une nouvelle paire de somites (S) est précédée de vagues décalées d'expression de l'*axin2* (en gris) et de celle (en noir) de *hairy* et de *Lunatic fringe* (Lfng). L'expression de *hairy* débute dans le mésoderme présomitique (PSM) insegmenté pour se restreindre progressivement à la région postérieure des somites formés où elle se maintiendra durant quelques heures. Une nouvelle vague d'expression de *hairy* débute alors.

En a, b s'achève la vague d'expression des gènes cycliques aboutissant à la formation du somite 2 (c), le somite 1 ayant été déjà individualisé lors de la vague précédente. De a à e, s'observe la restriction du domaine d'expression de *hairy* qui conduit à la formation de la paire de somites suivante S3 (f).

Il s'écoule environ 90 minutes entre la formation de deux paires successives (d'après Pourquié, 2003, modifié).

Chez la souris, le signal Notch serait également responsable de l'activation du gène murin *Mesp2*, (homologue de *c-Meso 1* et 2 du poulet). Son produit, un facteur de transcription, serait à l'origine de l'expression de *Eph4* impliquée dans les processus de scission aboutissant à la séparation des nouveaux somites (Watanabe et coll., 2005).

15 • Inductions embryonnaires pendant la gastrulation et la morphogénèse



Chez la souris, une seconde voie de signalisation, la voie Wnt, semble également impliquée dans une activation directe d'un gène cyclique (Aulehla et coll., 2003). De manière similaire à ce qui est observé pour *Lunatic-fringe* activé par le signal Notch, l'expression périodique du gène *Axin2* serait due à un rétrocontrôle négatif instable exercé sur la voie activatrice Wnt. Une interaction entre les deux voies paraît exister. En effet, l'expression cyclique de *Axin2* est maintenue lorsque la voie Notch est inhibée mais elle disparaît ainsi que celle de *Lunatic-fringe* quand la voie Wnt est inhibée. Ces observations laissent supposer que le signal Wnt se situe en amont de l'activation des gènes cycliques par la voie Notch (fig. 15.5).

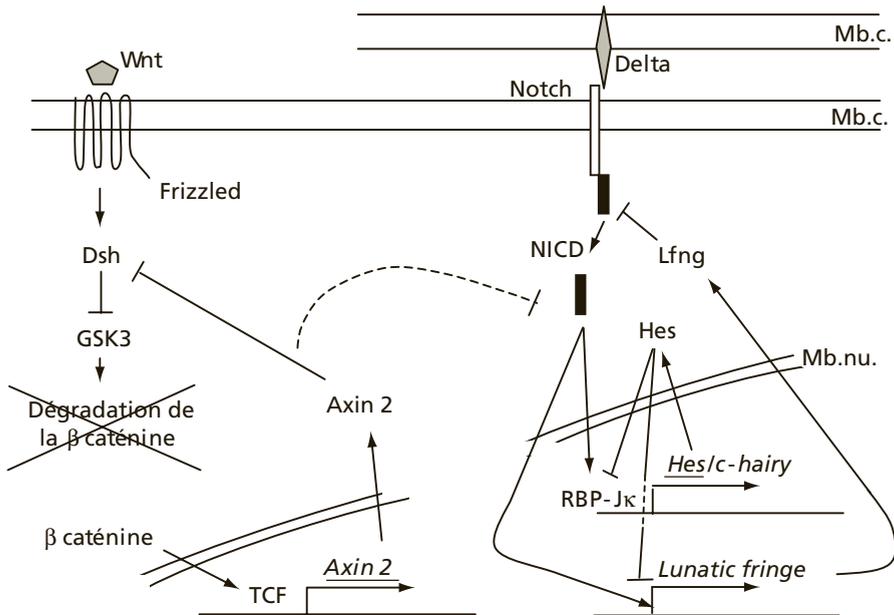


Figure 15.5 - Expression des gènes cycliques au cours de la somitogénèse chez les Vertébrés. (Schéma intégrant des données concernant le poulet et la souris).

L'activation des deux voies de signalisation Wnt et Notch déclenche respectivement l'expression du gène *Axin 2* et des gènes *Lunatic Fringe* et *Hes/c-hairy* (→). Leurs produits exercent de manière périodique des boucles rétro-actives négatives au niveau de chacune des voies considérées. La régulation en amont de la voie Notch par la voie Wnt est figurée en pointillé. Les gènes murins sont soulignés, *Lfng* est exprimé chez les deux espèces considérées. (Dsh : Dishvelled, GSK3 : Glycogène synthétase kinase, *Lfng* : Lunatic fringe, Mb.c. : membrane cellulaire, Mb.nu. : membrane nucléaire, NICD : Notch intracellular domain). (d'après Pourquié, 2003, modifié).

15.6.2 Relations entre la gastrulation et le fonctionnement périodique de l'horloge

La régression du nœud de Hensen chez les Oiseaux comme l'involution du mésoderme au niveau de la lèvre dorsale du blastopore chez les Amphibiens joue un rôle dans la périodicité de la somitogénèse. Les cellules qui franchissent le nœud de

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

Hensen secrètent un FGF (Fgf8) dont le niveau de concentration est déterminant pour le déroulement de la somitogenèse. Au sein du mésoderme pré-somitique, s'établit une distribution de transcrits Fgf8 selon un gradient décroissant, de la région caudale vers la région céphalique¹. Le domaine d'expression de Fgf8 s'étend jusqu'à la région où le patron de segmentation n'est pas encore établi de manière irréversible. Ce n'est qu'à partir d'un certain seuil, au-delà duquel les concentrations de Fgf8 deviennent suffisamment faibles, que peuvent se manifester des signaux rendant possible la segmentation somitique. Cette limite constitue le **front de détermination** marquant une zone de transition dans les modalités des régulations géniques s'exerçant dans les cellules du mésoderme pré-somitique (Fig.15.6). En effet, si une sur-expression de Fgf8 est réalisée, celle-ci provoque un blocage de la somitogenèse, les cellules du mésoderme pré-somitique restant « immatures », c'est-à-dire se maintenant sous un état de cellules mésenchymateuses capables de migration.

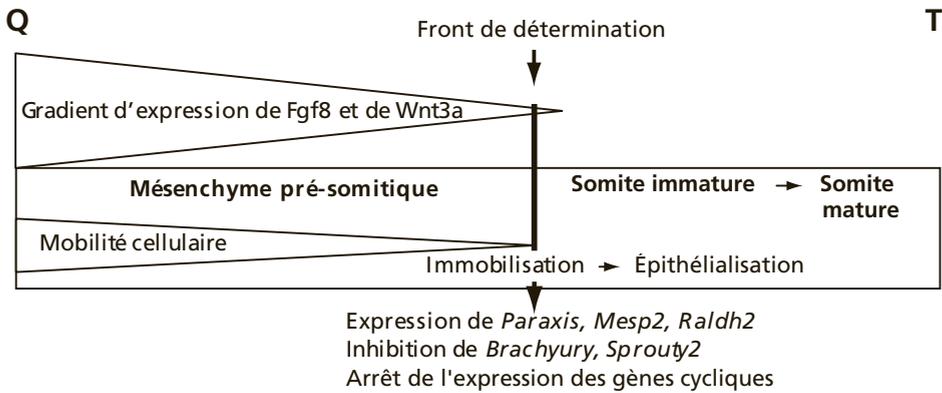


Figure 15.6 - Représentation schématique de la dynamique de formation des somites à partir d'une bandelette mésodermique pré-somitique.

Lorsque le nœud de Hensen régresse, les cellules sécrétrices de FGF suivent sa migration et s'éloignent ainsi des territoires pré-somitiques restés en position plus antérieure où Lunatic fringe était réprimé. Ces territoires sont donc libérés de l'influence de Fgf8, l'équilibre Notch-Lunatic fringe peut alors être réalisé.

C'est au niveau du front de détermination, sous la dépendance de la voie Notch, qu'est exprimé périodiquement le gène murin *Mesp2* dont le produit régule en amont l'expression de gènes codant pour des molécules impliquées dans la scission du matériel présomitique telles que celles du système Ephrine/Eph.



La limite entre un nouveau somite et le mésoderme présomitique a été pré-programmée par Hairy. La région postérieure du nouveau somite exprime Ephrine-B2 et la région la plus antérieure du mésoderme présomitique exprime le récepteur EphA4. Chaque nouveau somite exprime alternativement ces deux types de molécules, récepteur Eph dans

1. Un gradient d'expression de Wnt (Wnt3a), similaire à celui de Fgf8 quant à sa distribution, est également à noter.

sa partie antérieure et Ephrine dans sa partie postérieure. Ce mécanisme fonctionne dans d'autres modèles de répulsion intercellulaire, comme celui des cellules migrantes des crêtes neurales et la face postérieure des somites.

Ainsi la mise en place des limites des compartiments somitiques se trouve-t-elle directement sous la dépendance de l'horloge de segmentation. Au delà du front de détermination, les cellules engagées dans le processus d'épithélialisation cessent d'exprimer les gènes cycliques.



Chez le poulet, dans la région postérieure au front de détermination, la présence de Fgf8 à fortes concentrations déclenche dans les cellules mésodermiques l'expression des gènes *Brachyury* et *Sprouty2* et inhibe celle des gènes *paraxis* (impliqué dans le processus d'épithélialisation) et *Raldh2* (gène codant pour une enzyme nécessaire à la synthèse d'acide rétinolique)(Fig. 15.6). L'inhibition de ces deux derniers gènes s'effectue par l'intermédiaire d'une voie activée par la fixation du Fgf8 sur son récepteur et dans laquelle intervient la MAPK/ERK (Delfini et coll., 2005) (voir 11.1.2b). Le niveau d'activité de ERK contrôle directement la mobilité des cellules mésodermiques présomitiques. Des concentrations décroissantes de Fgf8 provoquent une inactivation progressive de ERK, ce qui se traduit par un ralentissement de la mobilité cellulaire jusqu'à une immobilisation au-delà du front de détermination, immobilisation qui s'accompagne du processus d'épithélialisation.

L'allongement de l'embryon auquel est associé le recul du nœud de Hensen vers la région postérieure provoque le déplacement du front de détermination vers l'arrière, ce qui modifie de manière dynamique la distribution de Fgf8 et de Wnt3a. La période du fonctionnement de l'horloge de segmentation (90min chez le poulet) correspond **au temps mis par le front de détermination pour atteindre la zone où se réalisera la prochaine scission du matériel présomitique**. La distance parcourue correspondra donc à la portion de mésoderme présomitique à partir duquel se formera un nouveau somite.

Le devenir de chaque somite est ensuite conditionné par un ensemble d'informations dépendant elles-mêmes de plusieurs catégories de gènes et notamment les gènes Hox qui s'expriment en des ensembles qui varient le long de l'axe antéro-postérieur du tronc (voir § 11.3) et les gènes Pax qui organisent la régionalisation dorso-ventrale des somites.

15.7 L'ASYMÉTRIE DROITE-GAUCHE CHEZ LES VERTÉBRÉS

Les Vertébrés présentent tous une organisation interne dissymétrique par rapport à un plan sagittal. C'est ainsi que, en ne considérant que les manifestations les plus visibles, le cœur des Amphibiens, des Sauropsidés ou des Mammifères se trouve à gauche, que les poumons des Mammifères ont deux lobes à gauche et trois lobes à droite, que le tube digestif avec ses glandes annexes est largement asymétrique. Si, dans de rares cas, (un sur 15 000 chez l'homme), cette organisation est totalement inversée, le sujet n'en ressent aucun trouble; il n'en est pas de même d'inversions partielles.

Les mécanismes qui contrôlent cette organisation commencent à être décryptés. Ils impliquent l'action de molécules organisatrices que nous avons vues intervenir au

cours du développement, dans les exposés qui précèdent et dont les aires d'expression ne sont pas symétriques par rapport au plan de symétrie bilatérale de l'embryon. Cette asymétrie serait induite très tôt. Des travaux sur le xénope suggèrent qu'elle le serait dès la réaction corticale de symétrisation. En effet, des injections ectopiques de la protéine Vgl dans l'œuf perturbent l'asymétrie normale de cet animal. **Il faut rappeler que la formation des éléments qui dérivent des somites, squelette axial, musculature du tronc, membres, échappent à cette dissymétrie à la suite de mécanismes régulateurs où intervient l'acide rétinéique ainsi qu'on le verra plus loin.**

15.7.1 L'asymétrie droite-gauche chez l'embryon du Poulet (fig. 15.7)

L'embryon de poulet est un modèle de choix pour ces études ; en effet, dès 20 heures de développement, une asymétrie se manifeste dans la courbure du tube cardiaque. Le résultat d'expériences réalisées avant ce stade peut ainsi être facilement contrôlé en examinant les anomalies qui en résultent dans l'asymétrie.

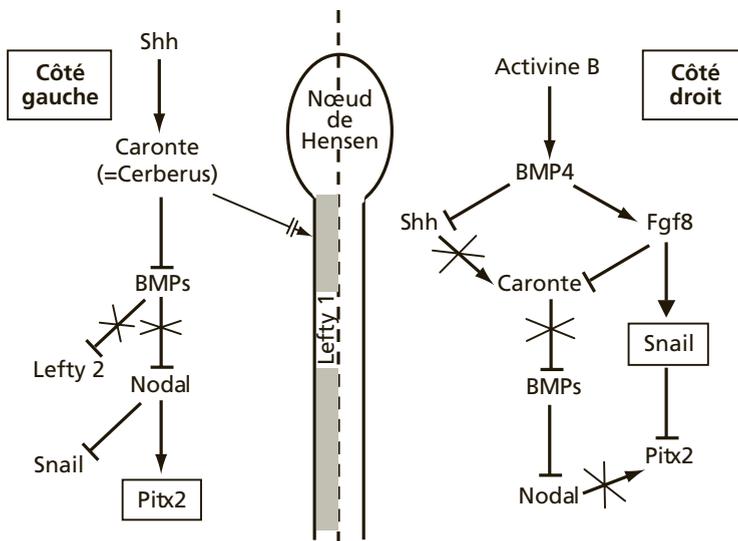


Figure 15.7 - Mise en place de l'asymétrie droite-gauche chez le poulet.

Du côté droit, l'activine B par des voies indirectes, inhibe l'expression de *sonic hedgehog* et active celle de *Fgf8* lorsque la ligne primitive a atteint son extension maximale. *Fgf8* active l'expression de *snail* dont le produit inhibe l'expression du facteur de transcription *Pitx2*. De plus, en absence du facteur paracrine Caronte (= Cerberus), antagoniste des BMPs, ceux-ci peuvent bloquer l'expression de *nodal* dont le produit aurait activé celle de *Pitx2*.

Du côté gauche, l'absence d'activine permet à *Shh* d'activer Caronte. Les BMPs, inhibés, ne peuvent pas exercer leur répression sur l'expression de *nodal* et de *lefty 2*. Dans ces conditions, le facteur paracrine Nodal inhibe *snail* et active l'expression du facteur de transcription *Pitx2*. Les signaux provoqués par Caronte ne peuvent pas accéder au côté droit en raison de la présence de *Lefty 1* localisé dans la moitié ventrale de la ligne primitive.

Le nœud de Hensen est organisé de façon asymétrique. La protéine régulatrice **Sonic hedgehog** y est présente dès 18 heures, du côté gauche, ainsi que dans la corde en formation ; du côté droit, son expression est bloquée par BMP4, elle-même activée par l'activine B. Le déterminisme de cette asymétrie reste hypothétique. Le signal d'asymétrie est ensuite transmis au mésoderme latéral. Dans le mésoderme de la lame latérale gauche, la production d'une molécule de la famille des TGF- β , **Nodal**, joue un rôle essentiel : toute anomalie dans la distribution de ce facteur perturbe l'asymétrie. La synthèse de Nodal avec son caractère asymétrique est induite par une série de molécules, dont une, **Caronte**, est le produit d'un gène proche de *cerberus*, *caronte*, activé par Sonic hedgehog. Caronte inhibe les BMP responsables de la répression de *Nodal* et de *lefty-2*. En étant exprimés, Nodal et Lefty-2 permettent l'expression du facteur de transcription Pitx2, de la famille de Bicoïd (voir § 11.3.5a) et la répression du gène *snail*. **Pitx2 serait responsable de l'exécution du programme morphologique propre au côté gauche.**

Dans le mésoderme de la lame latérale droite, l'**activine**, via BMP4, stimule l'expression de **Fgf8** et réprime Sonic hedgehog. L'activation de la chaîne Caronte-Nodal par Shh n'ayant pas lieu, Pitx2 ne s'exprime pas, cependant que Fgf8 active *snail*, celui-ci n'étant pas réprimé par Nodal. **L'expression de *snail* et l'absence d'expression de *Pitx2* constituent les caractéristiques du côté droit.**

Après que le nœud de Hensen a complètement régressé, le maintien de la corde est nécessaire au bon déroulement du programme d'asymétrie; elle est associée à la présence de molécules signal, comme **Lefty-1** de la famille des TGF- β . Cette dernière, antagoniste de Nodal, permet le maintien de l'expression de l'asymétrie en empêchant que les signaux de la chaîne Caronte-Nodal, spécifiques du côté gauche, n'affectent le mésoderme du côté droit.



Outre les multiples interactions moléculaires évoquées précédemment, l'implication de la voie de signalisation Notch a été également mise en évidence dans les processus aboutissant à l'expression de Nodal sur le côté gauche de l'embryon. Celle-ci serait à corréluer avec la mise en place précoce d'une asymétrie gauche/droite du potentiel membranaire des cellules situées près du nœud de Hensen. A gauche de celui-ci, les cellules présenteraient une réduction d'activité des pompes H⁺/K⁺-ATPase membranaires, ce qui entraînerait localement une élévation transitoire des concentrations en Ca⁺⁺ extracellulaire. Celle-ci, en modifiant l'affinité de Notch pour ses ligands Delta-like1 et Serrate1, serait à l'origine d'une hyperactivation de Notch du côté gauche (Raya et coll., 2004). Cette activation de la voie Notch, régulée par ailleurs par les vagues d'expression de Lunatic-fringe, permettrait finalement que le signal Notch s'ajoute à l'intervention de Sonic hedgehog pour induire, de manière asymétrique, l'expression de *Nodal*.

15.7.2 L'asymétrie droite-gauche chez les Mammifères

Chez la souris, le même principe de base que celui qui était évoqué précédemment à propos du poulet préside à la mise en place de l'asymétrie droite-gauche avec un rôle essentiel de Pitx2 pour induire l'organisation des structures gauches et de Snail pour induire celle des structures droites. Toutefois des différences se révèlent dans

Partie 3 • Mécanismes de la morphogénèse

les voies aboutissant à ce résultat. C'est ainsi que l'intervention chez le poulet de *caronte* à gauche, activé par Sonic hedgehog et inhibant l'expression de BMP, n'a pas été décrite chez les Mammifères ; de même on constate que Fgf8 qui est un élément de spécification du côté droit chez le poulet l'est du côté gauche chez les Mammifères (Fig. 15.7).

Dans tous les cas, dans les conditions normales de développement, on note la présence précoce de Nodal dans la moitié gauche de l'embryon, activant *Pitx2* et réprimant *snail*. Parmi les hypothèses émises à ce jour pour rendre compte de cette distribution différentielle, un modèle étudié chez la souris s'appuie sur le rôle primordial que joue la région nodale (ou nœud de Hensen), plus particulièrement les cellules ciliées présentes ventralement dans cette région. On observe que les cils de ces cellules sont animés de battements orientés vers la gauche créant ainsi un mouvement vectoriel de liquide extra-cellulaire, désigné sous le terme de **flux nodal**, qui serait indirectement à l'origine de la concentration de la protéine Nodal au niveau du mésoderme latéral gauche de l'embryon.

Des travaux récents (Tanaka et coll., 2005) ont montré que les cellules nodales stimulées par le FGF libéraient des vésicules renfermant de l'acide rétinoïque et Sonic hedgehog. Celles-ci transportées par le flux nodal, parviennent au niveau de la paroi gauche du nœud. La libération de leur contenu s'accompagne d'une élévation des concentrations en Ca^{++} , situation similaire à celle évoquée pour le poulet, et qui serait à l'origine de signaux provoquant selon des mécanismes qu'il reste à découvrir, l'activation de gènes tel que *Nodal* (Fig 15.8).

Le fait que des morphogènes, en l'occurrence ici l'acide rétinoïque et Shh, puissent être sequestrés dans des enveloppes lipidiques, serait susceptible d'expliquer les raisons pour lesquelles leur influence soit capable de s'exercer sur de longues distances par absence de leur solubilisation dans un environnement aqueux.

Le rôle d'un flux dans la répartition de Nodal, induit par une ciliature nodale, a été relevé chez certains Vertébrés (Essner et coll., 2002).

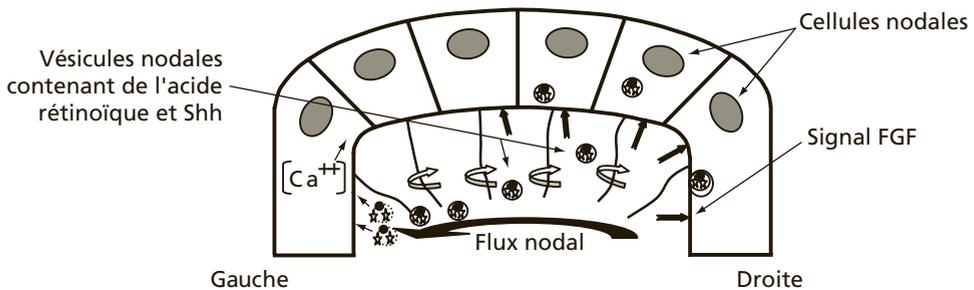


Fig. 15.8 - Représentation schématique du transport vésiculaire au niveau de la face ventrale du nœud de souris.

La réception de signaux FGF par les cellules nodales monociliées provoque la libération de vésicules contenant de l'acide rétinoïque et Sonic hedgehog. Le liquide extra-cellulaire est brassé par les mouvements rotatifs des cils, ce qui engendre un flux nodal qui transporte les vésicules sur le côté gauche du nœud, côté sur lequel se déversent les contenus vésiculaires. (d'après Tanaka et coll., 2005).



Il a été montré que chez le poisson-zèbre, au niveau de la vésicule de Kupffer, structure homologue du nœud des Mammifères, existait également une ciliature à l'origine d'un flux nodal analogue à celui observé chez la souris et qui était impliqué dans la mise en place de l'asymétrie gauche/droite (Kawakami et coll., 2005).

L'importance des mouvements ciliaires décrits au niveau du nœud est attestée par l'observation, chez la souris, d'anomalies résultant de mutations, provoquées ou spontanées, au niveau des gènes de moteurs moléculaires telle la dynéine. Ces mutations affectent l'existence même ou le sens des battements ciliaires et modifient le plan d'asymétrie.

15.7.3 Symétrie ou asymétrie ? Rôle de l'acide rétinoïque

Comme beaucoup d'embryons présentent originellement une organisation symétrique, il paraissait naturel de penser que celle-ci était établie par défaut et que ce n'était que secondairement que des signaux induisaient des asymétries corporelles. Cette idée qui prévalait encore récemment s'appuyait en particulier sur le fait que la somitogénèse se réalisait de façon symétrique. Or, nous avons vu que de manière précoce, se met en place une asymétrie corporelle. Comment concilier ces observations apparemment contradictoires ?

Ce n'est que tout récemment que furent découverts les premiers éléments permettant de rendre compte de cette apparente contradiction. Il a en effet été montré que lors de la somitogénèse existait un **signal protecteur contre les informations d'asymétrie**. Le facteur responsable de celui-ci, a été identifié comme étant l'**acide rétinoïque**.

L'acide rétinoïque est localisé dans les somites nouvellement formés et dans la région antérieure du mésoderme présomitique dans laquelle il se distribue de manière symétrique et effilée. Au cours de la somitogénèse, sa localisation progresse symétriquement vers la région postérieure. L'extinction chez la souris du gène *Raldh2* ou l'inhibition chez le poulet de son produit, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide rétinoïque, provoque une expression dissymétrique des gènes *Lfng*, *hairy* et *Msp2/c-Mesol*, et une mise en place asymétrique des somites. L'absence d'acide rétinoïque conduit donc à une non-coordination gauche/droite des vagues d'expression des gènes cycliques. On observe chez la souris, que dans ces conditions, le domaine d'expression du Fgf8 s'étend davantage dans la région antérieure droite du mésoderme pré-somitique, ce qui conduit à un retard dans la mise en place des somites sur le côté droit. La présence asymétrique de Fgf8, en provoquant un décalage dans le front de détermination, maintient sous un état immature plus prolongé les cellules mésenchymateuses du côté droit (Vermot et coll., 2005).

L'acide rétinoïque est nécessaire pour assurer la symétrie bilatérale dans la formation des somites et intervient lorsque le mésoderme présomitique émerge tardivement de la ligne primitive et que s'amorce l'horloge de segmentation du mésoderme somitique. Durant cette courte période, il limite l'expression du Fgf8 dans la région ectodermique la plus postérieure, et empêche ou module son expression ectopique dans l'ectoderme plus antérieur, incluant l'ectoderme nodal et le

neurectoderme. Si les signaux Fgf8 sont nécessaires au niveau du nœud de Hensen pour assurer l'asymétrie de certains tissus, cœur, organes viscéraux, etc., leur excès, à la suite d'une perte d'acide rétinoïque, stimulerait le nœud à générer une asymétrie également dans le mésoderme présomitique, aboutissant à une asymétrie gauche/droite dans la somitogenèse.

L'acide rétinoïque se comporte donc en antagoniste des signaux Fgf8, selon des mécanismes qu'il reste encore à découvrir. Il agirait également sur la synchronisation de l'horloge de la somitogenèse après qu'ait été mise en place une asymétrie gauche/droite précoce dans la région nodale.

L'acide rétinoïque est un dérivé du rétinol (vitamine A). Son excès ou sa carence provoque de graves malformations. Des asymétries comme la scoliose humaine ou une courbure droite-gauche anormale de la colonne vertébrale seraient ainsi provoquées par un défaut d'acide rétinoïque pendant la somitogenèse.

Il est d'autres grandes lignes du développement de l'embryon dont le point de départ a peu changé au cours de l'évolution. L'étude de l'expression des gènes Pax dans le développement de l'œil est un exemple de cette stabilité.

15.8 LES INDUCTIONS AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION DE L'ŒIL

Cet exemple montre une série d'actions inductrices complexes entre les constituants d'un futur organe. Il illustre également l'importance, dans cette organogenèse, d'un gène régulateur du développement qui se trouve au sommet d'une cascade d'événements nécessaires pour que la différenciation de l'œil soit menée à bien. La plupart des Invertébrés et tous les Vertébrés possèdent des yeux, élaborés ou rudimentaires. Nous verrons que toutes ces formations sont les résultats diversifiés de l'activité initiatrice d'un même gène qui a conservé une remarquable stabilité chez tous les Métazoaires.

Les inductions au cours d'une organogenèse, comme celle de l'œil, sont appelées des **inductions secondaires**, ou encore **de second ordre**.

15.8.1 Description sommaire de la morphogenèse de l'œil (fig. 15.9)

Cet organe comprend des formations ectodermiques et mésodermiques : la **rétine** et l'**iris** sont issus d'expansions de la vésicule cérébrale, le **cristallin** et la **cornée** sont dérivés de l'épiderme céphalique. Les enveloppes de l'œil, **choroïde** et **sclérotique**, sont d'origine mésodermique.

Chez les Vertébrés, au niveau du diencéphale, se forment latéralement deux expansions, les **vésicules optiques**, réunies entre elles par la bandelette chiasmatique. Ces vésicules s'étranglent au niveau de leurs pédoncules qui deviendront les nerfs optiques.

Elles se creusent en **cupules** dont la concavité est tournée vers l'extérieur. Les cupules sont formées de deux feuillets accolés, l'un se différencie en une couche réti-

15 • Inductions embryonnaires pendant la gastrulation et la morphogénèse

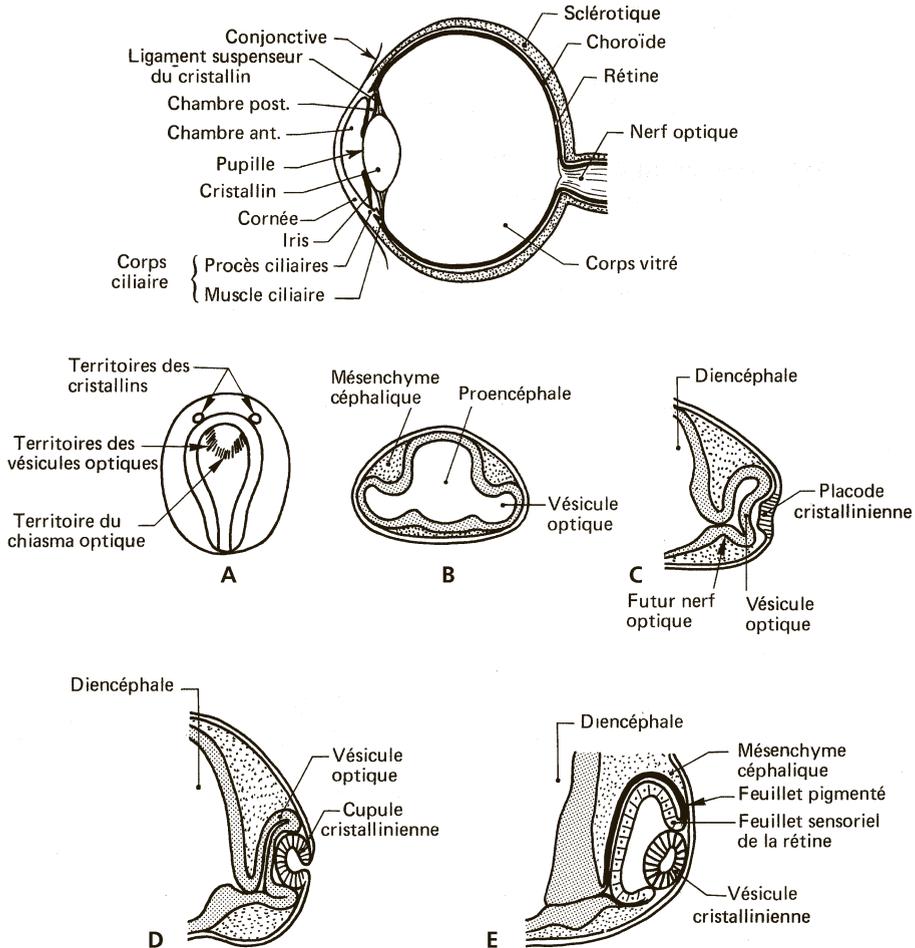


Figure 15.9 - Schéma d'un œil de Vertébré (œil humain) et différenciation de l'œil d'un Amphibien.

A : Territoires présomptifs sur la neurula. **B :** Coupe transversale au stade bourgeon caudal. **C, D, E :** Quelques étapes de la différenciation (**C :** placode cristallinienne, **D :** cupule cristallinienne, **E :** cristallin isolé).

nienne sensorielle tournée vers l'épiderme, et est doublé extérieurement par le second qui devient le feuillet pigmentaire. La périphérie de la cupule formera l'iris. Les cupules optiques s'appliquent contre l'épiderme céphalique latéral qui s'épaissit en une ébauche, la **placode cristallinienne** à l'origine du cristallin. Cette placode s'invagine, puis se referme en une **vésicule cristallinienne** qui s'isole de l'épiderme. L'épiderme refermé au-dessus de la vésicule forme la **cornée transparente**. Les espaces entre cristallin et cupule optique sont envahis par du mésenchyme qui se différencie en **corps vitré**. Le globe oculaire acquiert sa rigidité grâce à la différenciation d'une enveloppe mésodermique à forte trame de collagène, la **sclérotique**, cartilagineuse ou porteuse d'éléments osseux chez certaines espèces (Oiseaux).

15.8.2 Cette organogenèse est le résultat d'une série d'inductions

Les interactions actuellement connues entre les différents éléments formateurs de l'œil sont très nombreuses. Il n'en sera examiné que quelques-unes.

a) Formation de deux vésicules optiques latérales induite par le mésoderme précordial

À la fin de la gastrulation, l'ensemble de la plaque neurale antérieure possède des potentialités uniformes. Le toit de l'archentéron, sous cette région de la plaque neurale, est constitué par du mésoderme précordial qui va se dissocier ensuite pour former du mésenchyme céphalique. C'est sa présence qui induit le plancher du diencéphale à former des vésicules optiques, puis réduit ces potentialités à deux aires latérales de cette région. Si on fait l'ablation du mésoderme précordial, l'embryon sera anophtalme, c'est-à-dire dépourvu d'yeux ou sera cyclope et ne formera qu'une vésicule optique médiane. En effet, Sonic hedgehog est sécrété dans la plaque précordiale ; il induit la séparation en deux parties du champ oculaire unique en supprimant l'expression de *Pax6* dans la partie axiale de l'embryon (voir *infra*). Les parois des vésicules optiques induites sont le siège d'une activité mitotique accrue et une certaine turgescence interne du tube neural favorise leur expansion.

b) Différenciation du cristallin sous l'action d'une série d'inducteurs en direction de l'épiderme céphalique

Les travaux antérieurs, réalisés depuis ceux de Spemann en 1901, attribuaient le rôle inducteur essentiel à la vésicule optique et considéraient que tout l'ectoderme de la neurula était compétent pour former un cristallin. Ces conclusions, basées souvent sur des expériences de transplantation et de greffe, ne peuvent être retenues. Les techniques de marquage des tissus du donneur et du receveur ainsi que les méthodes purement morphologiques pour détecter un cristallin étaient insuffisantes.

Plus récemment, des travaux sur l'embryon de xénope entre les stades de la gastrula âgée et de la neurula âgée (Henry et Grainger, 1990) ont utilisé des donneurs de greffes dont les cellules étaient marquées par un marqueur fluorescent non diffusible. Les greffes sont réalisées en enlevant l'ectoderme qui, *in situ*, donne la placode cristallinienne puis le cristallin, et en le remplaçant par de l'ectoderme provenant d'une autre région dont on teste la compétence pour donner du cristallin. L'identification d'ébauche de cristallin se fait à l'aide d'anticorps dirigés contre les cristallines, protéines spécifiques et précoces du cristallin, identifiées par immuno-électrophorèse ou, sur coupes histologiques, par immunohistochimie.

– L'ectoderme céphalique à la périphérie de la plaque neurale est compétent pour se différencier en cristallin. Les greffes d'ectoderme ventral ne donnent jamais de cristallin.

– Cette compétence de l'ectoderme est acquise dès la mi-gastrula sous l'effet de premiers inducteurs qui proviennent essentiellement de la plaque neurale céphalique (à un moindre degré, également de l'endoderme céphalique) et qui ont **diffusé latéralement** dans le plan de l'ectoderme pendant la gastrulation et la neurulation.

– Parmi les protéines inductrices que sécrètent les vésicules optiques, on connaît *Fgf8* qui induit l'apparition du facteur de transcription *L-Maf* (Vogel-Höpker et coll., 2000) et *BMP4* qui induit l'expression des facteurs de transcription *Sox2* et *Sox3* (Furata et Hogan, 1998). La combinaison de l'expression de *Pax6* et de ces facteurs concourt à l'activation des gènes des cristallines et à son maintien, permettant ainsi la formation du cristallin à partir de l'ectoderme compétent.

– La différenciation du cristallin résulte de la transformation des cellules de la paroi interne de la vésicule cristalliniennne faisant face à la cupule optique (fig. 15.9) ; ces cellules s'allongent en fibres cristalliniennes primaires synthétisant des cristallines. C'est la cupule optique qui induit cette transformation. La paroi de la vésicule cristalliniennne voisine de l'ébauche de cornée devient un épithélium germinatif dont la prolifération fournit de nouvelles cellules qui se transforment en fibres secondaires, s'organisent en lamelles concentriques autour du noyau formé de fibres primaires, donnant ainsi au cristallin sa forme lenticulaire. Ces fibres deviennent transparentes et perdent leur noyau. Cette prolifération, qui devient très lente, dure pendant toute la vie de l'animal.

Le modèle que nous avons décrit est celui du xénope. Chez les Vertébrés, trois inducteurs du cristallin pourraient exercer une action avec, d'une espèce à l'autre, des différences dans l'importance relative de chacun d'eux (Jacobson, 1996) : l'ectoderme pharyngien, le mésenchyme céphalique et la vésicule optique.

c) Différenciation de la vésicule optique en rétine

La présence de mésenchyme céphalique et celle de l'ectoderme céphalique superficiel induisent la formation d'une placode cristalliniennne. Elles sont nécessaires à la croissance de la vésicule optique et à sa différenciation. En leur absence, la vésicule ne forme qu'un épithélium pigmenté et ne se creuse pas en une cupule. Dans les conditions normales, le cristallin induit à se différencier par la vésicule optique, rétroagit sur celle-ci en provoquant la différenciation de son feuillet interne en rétine sensorielle. Cette différenciation se manifeste par un accroissement de l'activité mitotique dans la future rétine sensorielle qui a pu être détectée par histo-autoradiographie après injection de thymidine ^3H . Le feuillet s'épaissit, les cellules filles migrent pour se placer à des niveaux qui correspondent aux différentes couches de la future rétine. La différenciation progressive qui suit s'achève par celle des cellules sensorielles visuelles. Le feuillet épithélial externe de la cupule rétinienne se pigmente en présence du mésenchyme céphalique. Cette différenciation reste un certain temps labile. On peut en effet, expérimentalement, transplanter les deux couches de la cupule optique non différenciée au contact d'une vésicule cristalliniennne, en les retournant, et inverser ainsi la destinée de chaque feuillet : ce qui devait devenir sensoriel devient rétine pigmentée, et réciproquement. L'environnement tissulaire est donc fondamental dans l'orientation de la différenciation.

Divers signaux sont impliqués dans la différenciation rétinienne. Des signaux BMPs induisent l'expression du facteur de transcription *MITF* qui est impliqué dans la différenciation du feuillet pigmentaire. Sous la dépendance régulatrice de *Otx2*, s'exprime le gène *Rx*, responsable de la spécification rétinienne. Le facteur de transcription, produit de ce gène, est responsable de l'activation de nombreux gènes, dont *Six3* et *Pax6*, impliqués respectivement dans la prolifération et la différenciation des neurones rétiniens.

d) Différenciation de la cornée transparente

L'épiderme céphalique situé au-dessus du cristallin devient la cornée transparente. Il serait déterminé depuis un stade antérieur du développement. C'est le cristallin qui induit la différenciation de l'épithélium de la cornée ; celui-ci est formé de cellules columellaires avec des espaces interstitiels réduits qui sécrètent à leur base des granules précurseurs d'une première trame de collagène. Cet épithélium est plus tard doublé par des couches condensées de cellules mésenchymateuses issues des crêtes neurales et d'une trame renforcée de collagène élaborée par des fibroblastes. L'ensemble devient transparent sous l'influence des premières sécrétions de thyroxine par la thyroïde en cours de différenciation. La cornée ne contient pas de cellules glandulaires. Cette différenciation peut être provoquée sur n'importe quel épiderme compétent de neurula au contact d'un cristallin ou d'un fragment de rétine. L'induction doit alors être permanente pour maintenir la transparence ; après ablation précoce du cristallin, la cornée s'opacifie.

La **sclérotique** se différencie au sein du mésenchyme autour de la cupule optique. De couleur blanche, elle réfléchit totalement la lumière ; elle est précocement déterminée mais on ne connaît pas son tissu inducteur.

15.8.3 Un même gène contrôle le développement des photorécepteurs de l'œil chez toutes les espèces

Une mutation unique peut empêcher le déroulement de la cascade d'inductions nécessaires à la formation d'un œil. Parmi les anomalies de cette organogenèse, on connaît la mutation *small eyes* chez la souris, qui entraîne une **microphthalmie** à l'état hétérozygote ; à l'état homozygote, la mutation est létale, l'embryon est dépourvu d'yeux et le système nerveux est anormal. L'**aniridie** chez l'homme (pas d'iris, yeux réduits) est la manifestation de la mutation à l'état hétérozygote ; sa forme homozygote est rarissime et létale. Le gène humain et le gène murin ont été isolés et sont identiques.

a) Les mutations *small eyes* de la souris et *eyeless* de la drosophile sont régulées par un même gène

Cette relation entre une seule mutation et la suppression de l'œil chez la souris a été rapprochée par l'équipe de W. Gehring à Bâle d'une autre mutation, *eyeless*, chez la drosophile dont l'unique gène responsable avait été isolé.

Le gène dont la mutation est responsable de *small eyes* chez la souris contient une homéoboîte homologue de celle des gènes Hox (voir § 11.1.1a) et une « paired box » homologue de séquences de gènes *paired* de la drosophile. C'est un gène Pax (voir § 11.3.5b), identifié dans cette famille de gènes sous le code *Pax6*. Le gène identifié chez la drosophile dont la mutation fait s'exprimer le caractère *eyeless* est le même : sa comparaison avec le gène de souris révèle des homologies de l'ordre de 90 % pour les séquences de bases des domaines de liaison à l'ADN, boîte « paired » et homéoboîte.

b) Le gène *eyeless/Pax6* suffit pour induire la cascade d'inductions nécessaires à la formation d'un œil chez la drosophile

Le niveau élevé de conservation du gène *Pax6* entre les espèces suggère l'importance de ce gène dans le contrôle de la différenciation d'un œil. À quel niveau son action se place-t-elle dans la suite de régulations qui interviennent dans cette organogénèse? L'expérience conçue sur la drosophile par Gehring et ses collaborateurs (1994) a consisté à transférer le gène sain isolé et amplifié, après l'avoir combiné à un vecteur qui lui permette de pénétrer dans les cellules et de s'exprimer. On choisit comme sites de transfection des parties du corps de l'embryon qui ne forment pas d'yeux dans un développement normal : des disques imaginaires d'ailes, de pattes ou d'antennes (voir note bas de page du § 11.2.5). Les mouches expérimentales se sont développées et, après métamorphose, présentent sur ces organes des yeux normaux et fonctionnels c'est-à-dire capables de transformer le signal lumineux en signal électrique (cependant, n'étant pas reliés au système nerveux, ces yeux sont évidemment aveugles). Le gène *Pax6/eyeless* de la drosophile peut donc déclencher l'activation coordonnée de toute la série de gènes nécessaires à la différenciation d'un œil de drosophile dans des tissus qui n'y étaient pas normalement destinés. Il se trouve donc au sommet de cette organisation.

c) Le gène *Pax6* de la souris peut remplacer celui de la drosophile

Les homologies qui existent entre les gènes des deux espèces font penser qu'ils ont été hautement conservés au cours de l'évolution (voir encart 15.7). Sont-ils interchangeable et **les yeux de toutes les espèces sont-ils induits par le produit d'un même gène?**

La démonstration du caractère général des potentialités organisatrices de ce gène a consisté à refaire les expériences de transfection précédentes entre espèces différentes. La transfection chez des larves de drosophile de *Pax6* de souris dans des

 ENCART 15.7 *Pax6* dans le règne animal

Ce gène a été découvert chez des espèces appartenant à des embranchements très éloignés les uns des autres : une Planaire, un Nématode, un Mollusque Céphalopode, un Oursin, une Ascidie et plusieurs espèces de Vertébrés. Cette découverte amène à conclure à une homologie entre tous les yeux et tous les organes photorécepteurs, même les moins élaborés. Ils sont tous pourvus de cellules photoréceptrices avec une même molécule photosensible, l'**opsine**, et ils transforment tous le signal lumineux en signal électrique. Le système de transduction des signaux, comprenant les protéines G et la GMP cyclique comme second messager, est le même dans toutes les espèces. L'efficacité du mécanisme a dû être telle qu'il a été conservé au cours de l'évolution, progressivement assorti d'adaptations et d'améliorations propres à chaque embranchement. Les yeux les plus simples ne possèdent pas de système de concentration des rayons lumineux comme le cristallin des yeux de Vertébrés ou les ommatidies de l'œil d'Insecte.

disques imaginaux de patte induit la différenciation d'yeux de mouche au niveau des pattes (Halder et coll., 1995). De même, la transfection du gène *Pax6* de drosophile dans l'ectoderme d'un embryon de xénope provoque l'apparition d'un œil d'amphibien en position ectopique chez le têtard.

Ainsi, hors de toute spécificité zoologique, *Pax6* est capable d'induire une cascade de signaux responsable de la formation d'un œil qui présentera les caractéristiques de l'espèce receveuse.

15.8.4 Un seul gène ne suffit pas à contrôler la différenciation d'un organe

L'image «un gène, un organe» serait évidemment sommaire. Un examen très simplifié du rôle de *Pax6* dans la différenciation de l'œil fera entrevoir la complexité du contrôle d'une organogenèse.

a) Le gène *Pax6* ne contrôle pas à lui seul toute la suite des événements inducteurs

On connaît actuellement une vingtaine de facteurs de transcription actifs qui se succèdent dans le développement de l'œil de Vertébré et qui activent eux-mêmes d'autres gènes régulateurs et des gènes effecteurs ; on sait par ailleurs que la formation d'un œil implique environ 2 500 gènes chez la drosophile.

b) Le gène *Pax6* s'exprime dans l'ectoderme compétent et la vésicule optique

Son ARN-m apparaît dans l'ectoderme de la tête chez l'embryon de souris puis se restreint progressivement à ce qui donnera la cornée et le cristallin ; on le retrouve dans les fibres cristalliniennes.

Dans la vésicule optique, son expression est associée au développement du feuillet interne de la rétine. Il ne sera pas ici question d'autres ébauches où il s'exprime aussi¹.

c) Les modes d'action du gène dans les ébauches de cristallin et dans la vésicule optique sont indépendants l'un de l'autre

L'expression de *Pax6* est nécessaire dans l'ectoderme pour que celui-ci forme l'ébauche de cristallin mais n'est pas nécessaire dans le signal inducteur émis par la vésicule optique comme le montre l'expérience ci-dessous.



La souris mutante homozygote *small eyes* ne forme pas d'œil ; les ARN-m de *Pax6* sont absents de l'épithélium de la tête alors qu'ils sont présents dans la neurorétine (Grindley et coll., 1995). Si on cultive de l'ectoderme de la tête d'embryon de mutant homozygote en présence d'une vésicule optique provenant d'un embryon normal ou hétérozygote, l'ectoderme de mutant ne forme jamais de cristallin, quelle que soit la nature de la vésicule optique associée. Par contre, un ectoderme provenant de la forme sauvage ou hétérozygote peut être induit à former en culture un cristallin par une vésicule optique de mutant.

1. *Pax6* est aussi un facteur de transcription actif dans le développement du système nerveux et du pancréas endocrine.

d) Le gène *Pax6* peut avoir des sites d'action multiples

L'exemple qui précède en fournit une illustration. Ce gène peut être transcrit à partir de deux promoteurs, et lui-même être régulé par plusieurs protéines régulatrices, dont l'activine A et Sonic hedgehog. Avec deux domaines de liaison à l'ADN, il peut diversifier ses sites de liaison et ses gènes cibles. Cette diversification est encore accrue par le jeu des épissures alternatives ; quatre formes au moins d'ARN-m et de protéines régulatrices Pax6 sont actuellement connues.

En résumé

L'étude de l'œil montre que, dans toute organogénèse, les interactions tissulaires sont réciproques et se succèdent suivant un programme parfaitement réglé et que des anomalies dans le déroulement des inductions peuvent déclencher des malformations, comme la cyclopie ou l'anophtalmie.

De telles interactions tissulaires en série sont tout à fait générales dans chaque type d'organogénèse ; on les a observées, par exemple dans la formation du foie, du poumon, du rein, du pancréas, des dents, des plumes, etc. On y retrouve toujours une dualité épithélium-mésenchyme, les rôles respectifs de chacun de ces composants étant toutefois variables suivant les cas.

Nous avons pu voir dans des chapitres antérieurs que, depuis le début de l'évolution des Métazoaires, des caractères anatomiques communs sont régulés par des gènes fonctionnels homologues : polarité antéro-postérieure du corps, mode de délimitation du territoire neural et épidermique, polarité des membres. L'exemple du gène *Pax6* fournit un exemple plus précis encore, en ce sens qu'il montre comment peut être réalisée la conservation d'une structure de base, d'un mécanisme physiologique, et d'un mécanisme de transduction des signaux pour l'exercice d'une même fonction.

15.9 CONSÉQUENCES DES INDUCTIONS

Dans tous les tissus qui reçoivent les informations d'un inducteur, on observe que les synthèses d'ADN, l'activité mitotique, les synthèses d'ARN et de protéines augmentent, que les champs morphogénétiques sont redéfinis et que les capacités de régulation diminuent.

15.9.1 Accroissement des synthèses d'ADN

Les synthèses d'ADN sont accrues quand l'induction est suivie d'une organogénèse. Au bout de quelques heures, on décèle dans l'ectoderme dorsal induit, une vague de mitoses et la formation d'une plaque neurale aux cellules plus nombreuses, plus étroites et plus hautes sur la même surface. On considère que ces mitoses permettent l'expression de gènes activés par l'induction. Au cours des inductions secondaires, des observations analogues ont été faites, par exemple dans l'ébauche de cristallin

pendant la formation de l'œil ou, dans le pancréas, pendant la différenciation des acini. Il faut toutefois noter que dans d'autres cas comme celui de l'induction épidermique par BMP4, cet effet n'est pas aussi marqué.

15.9.2 Activation de nouvelles synthèses d'ARN et de protéines

Les synthèses d'ARN et de protéines nouvelles sont plus abondantes et plus diversifiées dans l'aire dorsale de la gastrula de xénope que dans l'aire ventrale (Deuchar et coll., 1972). Des précurseurs radioactifs d'ARN (uridine ^3H) sont injectés à des jeunes gastrulas ; les mesures quantitatives effectuées montrent une radioactivité deux fois plus importante dans l'ectoderme dorsal que dans l'ectoderme ventral au stade de la gastrula âgée, avec des ARN de poids moléculaire élevé qu'on ne trouve que dans la région dorsale. Une étude comparative des protéines par immunoélectrophorèse montre, dès la fin de la gastrulation, l'apparition de protéines plus diversifiées et en plus forte concentration dans la région dorsale que dans l'aire ventrale.

Nous avons vu dans ce chapitre de nombreux exemples d'activation de la transcription de gènes provoquée par un inducteur. Ce sont d'abord des protéines régulatrices qui sont détectées, celles de la famille des TGF- β qui induisent en synergie avec d'autres facteurs, tel Siamois, la synthèse de Goosecoïd. Ce dernier activera à son tour l'expression d'autres régulateurs (voir fig. 12.10 et 12.11). Finalement, les synthèses de protéines spécifiques de tissus sont l'aboutissement obligatoire de toute induction, ce qu'on retrouve en étudiant les inductions dites de « second ordre ». C'est ainsi que, dès la gastrula âgée, la protéine Noggin, synthétisée dans le mésoderme axial, induit elle-même la synthèse de protéines spécifiques du système nerveux comme la N-CAM et la β tubuline neurale. De la même façon, l'activine induit la synthèse d'actine musculaire.

15.9.3 Champs morphogénétiques. Disparition des capacités de régulation

Au fur et à mesure que les inductions embryonnaires progressent, des territoires embryonnaires de plus en plus délimités sont déterminés et les capacités de régulation des déficiences ou des excédents à l'intérieur de ceux-ci disparaissent.

a) Aires d'expression des gènes homéotiques et champs morphogénétiques

Ces aires d'expression, réparties le long de l'axe céphalo-caudal sont parfaitement définissables, par exemple à l'aide de sondes d'ADNc, dès la neurula. Ce ne sont pas encore, dans un premier temps, des territoires morphogénétiques au sens classique du terme qui signifie territoires déterminés, mais des territoires spécifiés, c'est-à-dire non définitivement déterminés et encore moins différenciés, à partir desquels s'édifie un organe (voir encart 15.1). Cependant, les produits de ces gènes apportent une information de position sur l'axe antéro-postérieur dans les feuilletts ectodermiques, mésodermiques et endodermiques et donc sur le type d'organe qui se différenciera dans leur territoire d'expression.



Un bourgeon de membre antérieur de Vertébré se différencie à un niveau correspondant à la limite antérieure d'expression de *Hoxb-8* et *Hoxc-6*, un membre postérieur à la limite d'expression de *Hoxc-9* (voir §11.3.4a). Ces limites sont indépendantes du découpage en somites du mésoderme dorsal. *Hoxb-8* et *Hoxc-6* s'expriment dès le 4^e somite chez le Xénope, le 12^e chez la souris et le 19^e chez l'embryon de poulet.

Au stade du bourgeon caudal, les aires d'expression de ces gènes dans les noyaux des cellules forment des ceintures au sein du mésoderme, de la corde, des dérivés des crêtes neurales. L'expression de ces gènes est indispensable à la formation d'un bourgeon de membre.

b) Les capacités de régulation disparaissent tandis que les champs morphogénétiques se précisent

Si des fragments de neurula d'Amphibiens sont explantés et mis en culture (Holtfreter, 1931-1938), on constate que **le germe est devenu une mosaïque de territoires capables de s'autodifférencier**. La large capacité de régulation du mésoderme disparaît. Un explant de plaque neurale donne du tissu nerveux, un explant d'ectoderme ventral se différencie en épiderme. Si on étend ces expériences à tout le territoire de la neurula, il apparaît que tous les explants évoluent en fonction d'une destinée bien déterminée, sans réorganisation. Le germe devient une mosaïque de territoires déterminés ou **champs morphogénétiques**.

La situation devient comparable à ce qu'on observe dans l'embryon d'ascidie dès le début de la segmentation, ou dans l'embryon de drosophile, au moment où le blastoderme acquiert une structure cellulaire.

Les **champs morphogénétiques** sont des territoires de l'embryon qui ne représentent pas encore de différenciations visibles, mais qui représentent l'ébauche réelle d'un organe. Dans la gastrula, le territoire de l'endoderme est un champ morphogénétique, ainsi que le territoire cordo-mésodermique dans la blastula âgée.

Des territoires de plus en plus précis s'individualisent à mesure que le développement progresse. Au stade neurula, on peut établir une carte des champs morphogénétiques locaux. Ce sont des ébauches réelles (fig. 15.10). En effet, si on prélève le territoire correspondant à un organe, l'embryon en sera plus tard dépourvu. Si on greffe un champ surnuméraire, d'une patte par exemple, il possédera une patte surnuméraire : la régulation au niveau de l'ensemble d'un champ morphogénétique n'est plus possible. Cependant, **à l'intérieur d'un champ, des régulations sont encore possibles pendant un certain temps** : si on n'ampute dans une neurula d'Amphibien que la moitié du territoire d'une patte, le restant de l'ébauche peut encore, par régulation, édifier tout de même une patte normale quoique plus petite¹.

1. Des cas de régulation partielle peuvent parfois s'observer dans la nature. Ainsi il a été montré que des larves de Trématodes parasites, en fragmentant des champs morphogénétiques de la patte d'embryons de la rainette californienne *Hyla regilla*, provoquent l'apparition de pattes surnuméraires chez l'adulte.

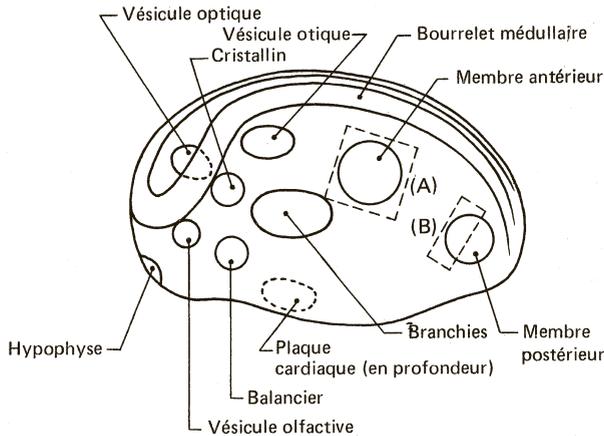


Figure 15.10 - Répartition des champs morphogénétiques dans une neurula âgée de triton.

Une explantation du territoire membre antérieur suivant le pointillé (A) supprime totalement ce membre. Il n'y a pas de régulation à partir des territoires voisins. Une ablation d'une partie du territoire du membre postérieur (B) aboutit au développement à partir du territoire restant d'un membre normal, mais réduit. Il y a eu régulation à l'intérieur du champ morphogénétique de la patte (d'après Houillon 1967, modifié).

Ultérieurement, des déterminations vont entraîner des spécialisations à l'intérieur de l'ébauche ; les axes du membre ne seront déterminés qu'au moment de l'apparition du bourgeon de membre (voir § 11.3.4c).

Une autre expérience classique porte sur le cœur : au stade de la neurula âgée, le tube cardiaque résulte de la fusion, en position médio-ventrale, de 2 ébauches mésodermiques issues des lames latérales. Si on greffe un fragment d'ectoderme entre ces deux ébauches, la fusion ne s'effectuera pas et chaque demi-ébauche évoluera en un cœur complet.

15.9.4 L'organogenèse s'accompagne de synthèses de protéines organo-spécifiques

Lorsque la gastrulation est achevée, l'organogenèse commence. Des protéines régulatrices, des protéines structurales spécifiques de la différenciation d'un type cellulaire donné (N-CAM, tubuline des cellules nerveuses), des protéines structurales spécifiques d'organes ou des enzymes sont identifiables avant que les organes ou les tissus soient bien individualisés. La nature de ces protéines nouvelles peut différer de celle des protéines de tissus adultes. Certaines sont en effet caractéristiques de l'embryon.

a) Quelques exemples de protéines de tissus adultes

- **La protéine MyoD.** Cette protéine régulatrice nucléaire, spécifique des tissus musculaires est induite par l'activine (voir § 16.2.2).
- **Les cristallines.** La synthèse de ces protéines du cristallin a lieu dans l'ébauche ectodermique du cristallin exprimant *Pax6*, quelques heures après qu'elle ait été induite par la vésicule optique.

- *La tyrosine dopa-oxydase.* Cette enzyme apparaît dans l'ectoderme neural induit pendant la gastrulation. Chez les Vertébrés, les cellules des crêtes neurales sont, entre autres, à l'origine des cellules pigmentées de la couche profonde de l'épiderme, les mélanocytes. Ces cellules possèdent une activité enzymatique caractéristique qui catalyse la formation de mélanine à partir de tyrosine due à la tyrosine-DOPA-oxydase. Chez l'amphibien, cette protéine a été mise en évidence à l'état naissant sur des polyribosomes extraits au stade neurula (Benson et Triplett, 1974), alors qu'auparavant on ne pouvait la détecter. La protéine apparaît donc dans les mélanocytes bien avant l'apparition d'une activité enzymatique qui se situe à l'éclosion (c'est en fait une proenzyme inactive). L'emploi d'actinomycine D injectée au stade mi-gastrula empêche toute apparition de la protéine, ce qui permet de penser qu'elle est la traduction d'un nouvel ARN-m transcrit dès la gastrulation.

b) Certaines protéines sont spécifiquement liées à la vie embryonnaire ou fœtale

- *L'hémoglobine.* C'est une protéine tétramérique, c'est-à-dire formée de 4 chaînes polypeptidiques, on connaît 5 gènes qui codent pour 5 types de sous-unités différentes : α , β , γ , δ et ξ . Ces gènes ne sont pas également actifs à tous les moments de l'embryogenèse ni de la vie fœtale. ξ est actif dans l'embryogenèse précoce, α et γ sont actifs pendant la vie fœtale et l'hémoglobine fœtale est essentiellement constituée par le tétramère $\alpha_2\gamma_2$.

Chez l'adulte, l'hémoglobine est constituée, pour la plus grande part, par $\alpha_2\beta_2$ et en petite partie par $\alpha_2\delta_2$. Nous avons donc ici un exemple de réduction d'activité de gènes (γ et ξ) au cours de la différenciation embryonnaire.

- *Le collagène de type I.* C'est une molécule tricaténaire constituée chez l'adulte de deux chaînes α_1 et d'une chaîne α_2 . Cette dernière n'apparaît que chez l'adulte, le collagène I n'étant constitué chez le fœtus et le jeune que par trois chaînes α_1 . Cette forme fœtale présente la particularité d'être plus facilement dégradée par des protéases que la forme adulte. Cette caractéristique facilite le remodelage de la matrice extra-cellulaire accompagnant la morphogénèse tendineuse et osseuse lors des processus de croissance. Des modifications de ce type sont également décrites pour d'autres collagènes tel le collagène V.

Résumé

L'induction dans le développement embryonnaire, telle qu'elle vient d'être décrite ne s'applique pas à tous les groupes zoologiques mais plus particulièrement aux Vertébrés.

Chez les Insectes, la régulation de l'expression génique nécessaire pour la différenciation d'une ébauche a lieu en grande partie dans un organisme syncytial, avant tout mouvement morphogénétique ; les transmissions de signaux d'une aire inductrice à une aire compétente sont différentes.

Résumé

Chez les Invertébrés à développement en mosaïque, dès les premières divisions, chaque cellule devient la cellule initiale d'un territoire qui se subdivise en régions de plus en plus définies, de telle sorte que la détermination cellulaire se met progressivement en place avant tout mouvement morphogénétique.

Chez les Amphibiens, le génome maternel, pendant l'ovogenèse, transcrit des informations qui, sous forme d'ARN ou de protéines, se répartissent dans le cytoplasme ovocytaire. Dès la fécondation et le début de la segmentation, elles contribuent, par leur distribution entre des blastomères différents, à créer des territoires aux potentialités très larges. Ces territoires sont le site d'expression de gènes régulateurs organisant les polarités de l'embryon.

Des protéines inductrices sont les instruments de transmission d'informations entre territoires, conduisant à l'expression de gènes nouveaux et à des différenciations nouvelles. La majorité de ces échanges n'est possible que pendant ou après les mouvements morphogénétiques qui créent des voisinages et des associations cellulaires nouvelles entre tissu inducteur et tissu compétent.

Toute induction implique deux partenaires : un tissu compétent et un tissu inducteur.

Un territoire embryonnaire qui reçoit une information est rarement neutre. Son origine dans l'œuf, son contenu cytoplasmique, les échanges auxquels il a participé dans les étapes antérieures de la morphogenèse ont régulé l'expression d'un certain nombre de gènes, ce qui lui confère dans beaucoup de cas une aptitude à réaliser une gamme de différenciations plus ou moins large au moment où un signal inducteur lui parvient. Cette aptitude correspond à son niveau de compétence ou de protodifférenciation (Wessels, 1968).

La compétence d'un tissu embryonnaire pour fournir une structure donnée est transitoire et évolutive, comme le montre l'étude de l'aptitude de l'ectoderme de la gastrula, puis de la jeune neurula à former du tissu nerveux.

La succession des expressions de protéines régulant des gènes de polarité et des gènes homéotiques permet de concevoir cette programmation de la compétence. En devenant compétentes, des cellules acquerraient, pour un certain temps, des récepteurs membranaires ou cytoplasmiques, plus ou moins spécifiques de molécules inductrices. L'action d'une de celles-ci déterminerait une sélection parmi des programmes possibles rendus accessibles pendant la protodifférenciation. Cette reprogrammation de l'activité génique n'est possible qu'après quelques cycles mitotiques déclenchés par l'induction. Le tissu compétent s'engage alors dans une voie de différenciation comportant une phase de pré-différenciation encore réversible, la spécification, à laquelle succède une phase irréversible constituant la détermination. Quand celle-ci est réalisée, on détecte les premières protéines spécifiques : c'est le début de la différenciation.

Questions

- 15.1** Quelle différence existe-t-il entre les termes spécification et détermination ?
- 15.2** Quels sont les types de tissus issus d'une lèvre dorsale de blastopore après la greffe de celle-ci dans un embryon receveur ?
- 15.3** Quelles conclusions peut-on déduire des expériences d'exogastrulation ?
- 15.4** Quelle filiation territoriale embryonnaire peut-on relever à partir de la zone du croissant dépigmenté des œufs fécondés d'Amphibiens ?
- 15.5** À quoi correspond la notion de compétence ?
- 15.6** Pour quelle raison l'induction neurale est-elle qualifiée de « par défaut » ?
- 15.7** Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la somitogénèse ?
- 15.8** La symétrie bilatérale est-elle instaurée d'emblée lors de l'embryogénèse des Vertébrés ?
- 15.9** Que désigne-t-on par flux nodal dans la mise en place de l'asymétrie gauche-droite chez la souris ?
- 15.10** Donner la succession des inductions impliquées dans la morphogénèse oculaire.
- 15.11** Que désigne-t-on sous le terme de champ morphogénétique ?

Réponses page 392

EXPRESSION DU GÉNOME EMBRYONNAIRE

- 16.1 Évolution de la population d'ARN-m de l'ovocyte aux premiers stades du développement
- 16.2 Synthèses d'ARN-m nouveaux et différenciation
- 16.3 Effets régulateurs du cytoplasme sur l'expression des gènes
- 16.4 Clonage par transplantation de noyaux somatiques dans des ovocytes de Mammifères
- 16.5 Cellules souches embryonnaires

C'est à un stade toujours précoce, mais différent suivant le type de développement, que débute la transcription d'ARN-m à partir du génome embryonnaire. Nous avons décrit l'activation de ces synthèses chez l'oursin, le xénope et les Mammifères en étudiant la segmentation. Cet examen envisageait toutes les catégories d'ARN sous un aspect quantitatif. Après avoir étudié quelques aspects de la morphogénèse : mouvements morphogénétiques, inductions, nous abordons ici l'évolution qualitative des synthèses d'ARN-m qui est souvent le résultat d'inductions, comme cela a été dit dans le précédent chapitre.

– Lorsque la transcription du génome de l'embryon débute, **une grande part des ARN-m transcrits n'assure que le remplacement de messagers déjà synthétisés pendant l'ovogénèse.**

Cette activité qui aboutit donc à la synthèse des mêmes protéines que celles qui étaient codées par le génome maternel est une caractéristique commune à tous les développements étudiés, Oursins, drosophile, Amphibiens et Mammifères

– La seconde catégorie d'ARN-m synthétisés correspond à des gènes qui s'expriment pour la première fois pendant le développement embryonnaire. Ils codent pour des protéines inductrices, des protéines régulatrices de polarité, des protéines régulatrices homéotiques, des protéines spécifiques de tissus et d'organes. Ils ne forment qu'une très faible fraction des gènes actifs pendant l'embryogénèse. Chez la drosophile par exemple, l'analyse en électrophorèse bidimensionnelle du patron de synthèses de protéines à différents stades montre que 6 % seulement des 1 200 protéines visualisées apparaissent pour la première fois pendant la gastrulation et l'organogénèse, le restant était déjà présent dans l'œuf.

Nous étudierons d'abord la complexité des ARN-m traduits chez l'oursin, puis chez des Vertébrés. Nous examinerons ensuite quelques synthèses d'ARN-m tardifs, liées à la différenciation, en montrant que certaines apparaissent comme une conséquence directe de l'induction.

16.1 ÉVOLUTION DE LA POPULATION D'ARN-m DE L'OVOCYTE AUX PREMIERS STADES DU DEVELOPPEMENT

16.1.1 ARN-m traduits chez l'embryon d'oursin

L'utilisation d'une technique d'hybridation ADN-ARN a permis d'étudier la composition du message traduit pendant le développement de l'oursin (Galau, 1976). Seules des séquences d'ADN non répétitives et pouvant être traduites en ARN-m sont utilisées. Les autres séquences d'ADN qui ne correspondent pas à un ARN-m connu et qui sont souvent répétitives, sont éliminées.

Les ARN étudiés sont les ARN-m totaux d'ovocytes mûrs et les ARN-m extraits des polyribosomes isolés à partir d'embryons à différents stades (blastula, gastrula, pluteus) ou d'organes d'adultes. Ces derniers sont donc des ARN-m activement traduits.

a) Comparaison entre les ARN-m de l'ovocyte et les ARN-m traduits aux différents stades

Il est montré que **toutes les séquences d'ARN-m de la gastrula sont déjà présentes dans les ARN-m maternels de l'ovocyte mûr**. En outre, cet ovocyte contient un lot équivalent de séquences qu'on ne retrouve plus traduites dans les ARN des polyribosomes de la gastrula.

La complexité totale des ARN-m de blastula est plus faible que celle de l'ovocyte et supérieure à celle de la gastrula.

Chez la larve pluteus qui a déjà atteint un certain niveau d'organisation, la complexité des ARN-m s'est réduite par rapport à la gastrula.

Dans les différents organes adultes, la complexité des messages traduits a fortement diminué ; chaque fonction spécialisée nécessite un nombre d'informations bien plus restreint que pour une morphogénèse complète.

b) Chez la blastula, la transcription d'informations nouvelles est faible

Pendant la segmentation, des ARN nouveaux sont synthétisés. Pour évaluer la nouveauté des messages portés par ces ARN, par rapport à ceux de l'œuf, des hybridations moléculaires ont été réalisées entre les ARN-m de blastula et les ADN non répétitifs d'où avaient été éliminées les séquences codantes maternelles.



Les hybridations obtenues permettent de calculer que les ARN-m nouveaux, absents dans le cytoplasme de l'œuf vierge mais exprimés dans la blastula, constituent environ 10 % de la population totale d'ARN-m (Wold, 1978). Il y a donc chez la blastula expression de « **gènes tardifs** » porteurs d'informations nouvelles (complexité équivalente à $3,4 \times 10^6$ nucléotides). Nous verrons qu'ils sont le moteur de la différenciation. Cependant, le taux de complexité de ces ARN-m tardifs mesuré chez la gastrula est plus faible (5×10^5 nucléotides). On estime que 8 500 types de messages différents sont alors exprimés.

c) Renouvellement des molécules d'ARN-m maternels pendant le développement

Les molécules d'ARN-m transcrites dans l'ovocyte ne restent pas stables pendant le développement. On a montré que celles qui restent présentes pendant le développement sont en réalité le résultat d'un «turn-over» important, les molécules étant dégradées et re-synthétisées. Ces synthèses de remplacement forment donc une part importante des synthèses totales chez l'embryon.

Il a été calculé que 90% des séquences d'ARN-m de l'embryon sont déjà présentes dans les ARN maternels et 8 % seulement constituent les transcrits nouveaux des gènes tardifs.

16.1.2 ARN-m traduits chez les Vertébrés

a) Chez le xénope

On retrouve les mêmes caractéristiques que celles qui sont observées chez l'oursin. Des sondes d'ADNc complémentaires d'ARN-m de gastrula ont été fabriquées. Elles s'hybrident fortement avec les ARN-m de l'ovocyte (80 %) (Dworkin et Dawid, 1980). Les nouvelles catégories d'ARN-m extraits de polyribosomes apparaissent essentiellement après la gastrulation, quand l'organogenèse commence. L'étude des électrophorèses bidimensionnelles montre aussi une forte continuité dans la synthèse de polypeptides communs avant et après la mi-blastula avec, seulement à partir de la gastrulation, l'apparition de nouveaux polypeptides.

Une comparaison entre des ARN-m de gastrula et de têtard métamorphosé montre qu'aucun des 30 ARN-m présents dans la gastrula qui ont été clonés et traduits en sonde d'ADNc au moyen d'une transcriptase inverse ne se retrouve après la métamorphose (Sargent et Dawid, 1983) (voir aussi § 16.2.1).

Si on compare maintenant la variété des synthèses dans l'organisme embryonnaire entier (gastrula) et dans un organe adulte (foie), la complexité des synthèses chute fortement. On retrouve là les mêmes données que dans l'étude de Galau, sur l'oursin.

b) Chez les Mammifères

L'étude comparative de nombreuses électrophorèses bidimensionnelles a montré que la plupart des protéines synthétisées pendant la segmentation continuent à être produites à travers tous les stades de préimplantation. De petits lots de protéines apparaissent à différents stades, résultant de la transcription de nouveaux gènes zygotiques. Parmi eux, des polypeptides sont synthétisés pour la première fois respectivement aux stades 2, 8 blastomères, après compaction de la morula et pendant la formation du blastocyste.

En résumé

Le fait que les gènes transcrits dans l'embryon soient en majorité identiques à ceux qui sont transcrits dans l'ovocyte est un caractère tout à fait général (*Cæno-rhabditis*, drosophile, Oursins, xénope et Mammifères).

Ceci est aisé à comprendre pour une partie de ces gènes qui codent pour les protéines structurales et les enzymes communes à toute cellule vivante appelées

parfois « protéines de ménage ». La plus grande part de l'activité de transcription de l'embryon est donc consacrée à remplacer des ARN-m homologues. Les ARN-m tardifs qui ne constituent qu'une faible minorité du message total contribuent à la synthèse des inducteurs, des protéines régulatrices et des protéines spécifiques qui apparaissent lors de la différenciation des tissus et des organes.

On pourrait croire que la complexité des ARN utilisés pour les synthèses de protéines augmente avec la complexité biologique de l'embryon, mais il n'en est rien. Les expériences de Galau montrent même, chez les Oursins, que la complexité totale des ARN des polyribosomes diminue légèrement pendant le développement.

Toutefois, on ne comprend pas encore pourquoi une large partie des gènes exprimés chez le jeune embryon ne l'est plus dans les cellules d'adultes. Il faut imaginer que l'information nécessaire pour le début de l'organogenèse est infiniment complexe, réclamant les messages préparés d'avance par l'ovocyte et renouvelés par « turn-over ». L'environnement cytoplasmique varié où se retrouvent les noyaux des blastomères doit progressivement moduler l'expression des gènes tardifs qui confèrent aux blastomères leur spécificité ou détermination que nous avons évoquée dans les chapitres antérieurs. Les relations nouvelles qui s'établissent entre les cellules des feuillettes pendant les mouvements morphogénétiques, génèrent des signaux au cours de l'induction ; ceux-ci activent à leur tour des gènes tardifs dont l'expression conduira à de nouvelles déterminations des tissus induits.

16.2 SYNTHÈSES D'ARN-m NOUVEAUX ET DIFFÉRENCIATION

Le stade du développement auquel on distingue des noyaux fonctionnellement différents varie largement d'un groupe zoologique à l'autre. Chez le xénope, il se forme des milliers de cellules avant que la reprise des synthèses d'ARN-m ait lieu à la mi-blastula. Chez les Oursins et chez *Cænorhabditis*, des synthèses différentielles sont observées dans certaines lignées cellulaires quand l'embryon ne comprend que quelques centaines de cellules.

Une spécialisation régionale se manifeste toujours dans la nature des messagers transcrits. Deux mécanismes peuvent jouer pour déclencher cette spécialisation : les localisations cytoplasmiques dont nous étudierons le rôle à la fin de ce chapitre et les inductions dont nous avons vu des exemples dans les chapitres précédents.

16.2.1 Mise en évidence d'ARN-m nouveaux après la mi-blastula, chez le xénope

On peut montrer une évolution dans la nature des gènes exprimés après la mi-blastula et dans la gastrula en constituant, à partir des ARN-m nouveaux, des sondes d'ADNc radioactives ou marquées par un fluorochrome. Celles-ci permettront de vérifier à d'autres stades la présence des ARN-m ayant servi de modèles.

a) Isolement d'ARN-m, constitution de sondes d'ADNc, sélection de sondes spécifiques d'un stade de développement



Les ARN-m sont d'abord isolés des autres ARN grâce au fait qu'ils possèdent pour la plupart une séquence terminale de résidus adényliques, la séquence poly(A), ajoutée en 3' après la transcription sous l'action d'une poly(A) polymérase. Cette terminaison facilite la purification des ARN-m par chromatographie d'affinité : si des polymères tels que l'acide polythymidylique (polyT) sont liés à un support, ils peuvent retenir après filtration des ARN totaux, les molécules d'ARN-m poly(A) par hybridation « A-T », les ARN-r et ARN-t n'étant pas retenus.

Après incorporation d'uridine ^3H à la mi-blastula et isolement des ARN-m poly(A) radioactifs, il a été montré que dans la gastrula, les ARN radioactifs représentent 40 % de l'ensemble des ARN-m poly(A) de l'embryon. Comme la quantité totale de ces ARN n'a pas varié depuis l'œuf, il apparaît qu'une bonne part des molécules maternelles a été dégradée et remplacée par des ARN nouveaux.

Comme cela fut évoqué précédemment, une grande part des synthèses nouvelles est donc constituée de transcrits identiques aux transcrits maternels dégradés. Il existe cependant une part de molécules qualitativement nouvelles. Ce sont les plus importantes, car on peut penser que, de leur traduction, résultent les protéines nécessaires à la gastrulation et à la mise en place du plan de morphogenèse.



On peut comparer les différentes séquences d'ARN-m poly(A) présentes dans l'embryon à différents stades. Les ARN poly(A) exprimés dans la gastrula sont transcrits en ADN complémentaires (ou ADNc) à l'aide d'une transcriptase inverse. Les sondes obtenues peuvent être soit radioactives, car des nucléotides ^3H ont été fournis pour cette synthèse, soit marquées par un fluorochrome.

Cette population d'ADNc est hybridée ensuite avec des ARN poly(A) extraits de l'œuf. L'ensemble des hybrides ADNc et ARN qui se formeront vont retenir des séquences du génome qui étaient exprimées à la fois dans l'œuf et dans la gastrula. On les éliminera par chromatographie ; les ADNc non hybrides qui seront recueillis correspondent à des ARN-m poly(A) exprimés dans la gastrula seulement.

b) Mise en évidence de variations dans la transcription du génome (fig. 16.1)

À partir des ARN-m synthétisés chez la gastrula, une série de séquences d'ADNc a été établie. Ces clones constituent un échantillonnage de **gènes tardifs**. En les hybridant avec des ARN-m poly(A) provenant d'une série d'embryons allant de la jeune blastula au bourgeon caudal, on peut apprécier la période pendant laquelle chacun de ces gènes s'exprime et les quantités d'ARN-m transcrits (Jamlich et coll., 1985). Certaines sondes s'hybrident précocement avec des ARN-m de la blastula âgée, d'autres plus tardivement pendant la gastrulation. La durée pendant laquelle la réaction d'hybridation est positive est variable suivant la nature des ADNc. Certains gènes ne sont exprimés que transitoirement et leurs ARN-m cessent progressivement d'être transcrits, ce sont les plus nombreux. D'autres gènes s'expriment au-delà des limites de l'expérience. L'intensité de l'hybridation varie au cours du temps pour

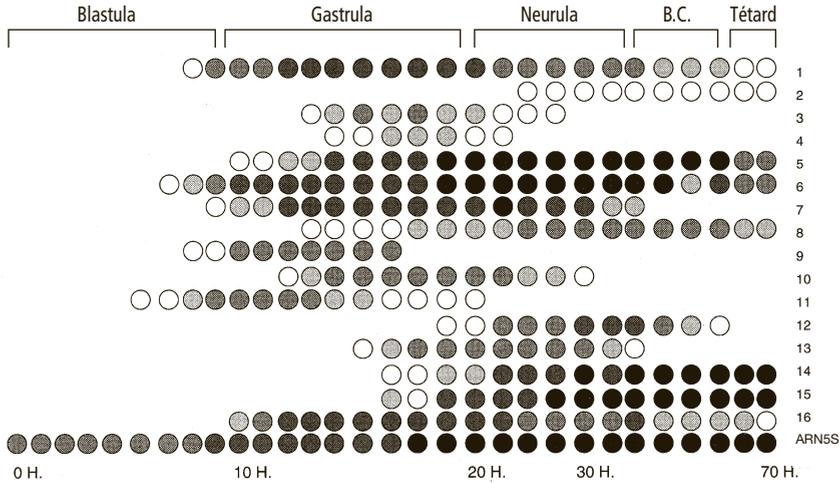


Figure 16.1 – Évolution du taux de transcription de 16 gènes de xénope au début du développement embryonnaire.

Des ARN-m poly(A) purifiés, extraits d'embryons allant de la blastula au têtard sont hybridés avec des ADNc qui sont constitués à partir d'ARN-m poly(A) de gastrula. Il a été réalisé 16 sondes d'ADNc correspondant à 16 gènes. BC : Bourgeon caudal. Le schéma représente les résultats d'hybridations réalisées sur filtre de nitrocellulose. Chaque sonde est représentée par une bande horizontale ; une bande complémentaire témoin correspond à la sonde d'ADNc d'un ARN 5S, présent à tous les stades. A chaque lot d'ARN-m poly(A) extrait d'un stade de développement (30 stades), correspond une colonne verticale. Les sondes d'ADNc sont radioactives ; seules les molécules hybridées avec un ARN-m sont conservées sur les filtres après rinçage et sont révélées par autoradiographie ; l'intensité du marquage est fonction de la quantité d'ARN-m hybridé. L'âge en heures des embryons est indiqué au bas de la figure (d'après Jamlich et coll., 1985).

une même sonde d'ADN, avec des maxima qui se situent à des périodes propres à chaque gène. D'autre part, chacun de ces différents gènes a une intensité d'expression qui lui est propre.

16.2.2 L'activation des gènes de la myogenèse : un exemple d'activation de gènes tardifs

Cet exemple a été choisi pour suivre, dans une organogenèse donnée, une série d'activations de gènes par des inducteurs et des protéines régulatrices. Il ne s'agit pas d'étudier ici la différenciation des fibres musculaires.

a) La famille des protéines MyoD pour « Myoblast Determination protein » (Devis, 1987)

Ce sont des protéines régulatrices de la myogenèse qui ont toutes la même structure, avec des sites de liaison à des régions de l'ADN adjacentes à des gènes spécifiques de la myogenèse qu'ils activent. Il en existe une forme chez toutes les espèces possédant des muscles striés, comme la drosophile, les Nématodes, les Oursins (Atchley et coll., 1994).



Les Vertébrés possèdent quatre formes de MyoD résultant probablement de deux duplications géniques successives. **MyoD** et **Myf-5** sont les premières formes à être activées dans les myoblastes, elles peuvent se substituer l'une à l'autre mais, en l'absence de l'une et de l'autre, il ne se différencie pas de muscles, et la double déficience est létale. MyoD est un inducteur puissant, capable d'induire une différenciation musculaire à partir de fibroblastes, d'adipocytes ou de neuroblastes. Au cours de la cytodifférenciation, ces facteurs de transcription induisent à leur tour, dans les myoblastes, la synthèse des deux autres formes, la **myogénine** et **MRF-4**. Chacun d'eux, combiné à d'autres facteurs, induit la synthèse des ARN-m et des protéines constitutives du muscle.

b) Transcription de MyoD à partir de la mi-blastula

MyoD est la protéine régulatrice de la myogenèse qui est la plus anciennement connue et la mieux étudiée. Chez les Amphibiens à partir de la mi-blastula, des ARN-m de MyoD ont été détectés dans des territoires embryonnaires autres que le territoire présomptif du mésoderme (Rupp et Weintraub, 1991) et notamment dans toute la coiffe animale. Cette période de transcription ubiquiste est brève, elle se situe juste après la mise en route de l'activité de transcription du génome embryonnaire et les ARN-m ainsi transcrits sont rapidement dégradés. La protéine synthétisée reste dans le cytoplasme et ne joue donc pas son rôle de régulateur de transcription. Ce mode d'activité faible et transitoire à la mi-blastula a aussi été observé sur d'autres gènes. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cet état dé-réprimé pourrait être une manifestation de la compétence des cellules pour former du tissu musculaire. Celle-ci ne serait suivie de différenciation que sous l'effet d'un inducteur mésoblastogène ; ailleurs, les gènes sont réprimés.

Après la transition blastulienne, *MyoD* ne s'exprime plus que dans le mésoderme de la zone marginale, mais la protéine est devenue active, elle pénètre dans le noyau et joue son rôle régulateur en se liant en amont de son propre gène et en empêchant son inactivation. Toute la zone marginale est alors compétente pour former du tissu musculaire.

c) Transcription de MyoD dans la gastrula

À la gastrulation, le mésoderme axial induit latéralement la différenciation des structures somitiques (voir § 15.6). Les gènes *MyoD* sont alors transcrits en ARN-m uniquement dans les somites qui restent compétents pour former des muscles. La protéine MyoD y est stable et active. Le mésoderme plus ventral, où le signal inducteur de l'activine ne parvient pas, perd sa compétence : le gène *MyoD* est inactivé. Il s'y forme les lames latérales, les pièces intermédiaires, les îlots sanguins.

d) Synthèse des protéines de la famille MyoD après la gastrulation

Chez les Vertébrés, les cellules destinées à se différencier en myoblastes proviennent des somites.



Chaque somite est soumis à des inductions de la part des ébauches voisines. La région la plus axiale, sous l'influence de Sonic hedgehog sécrété par la corde et la face ventrale du tube neural, forme le sclérotome, ébauche d'éléments du squelette, vertèbres et côtes. La

partie latérale donne le dermomoyotome qui se divise en trois secteurs, le précurseur du derme, plus superficiel et les deux territoires précurseurs des muscles, l'un du tronc et l'autre des muscles abdominaux et des membres. Le territoire des muscles dorsaux du tronc est induit par des protéines issues du système nerveux appartenant à la famille Wnt ; le territoire des muscles des membres est l'objet d'une induction combinée de BMP4 sécrété par le mésoderme latéral et d'une autre protéine Wnt provenant de l'épiderme (Cossu et coll., 1996).

Des gènes régulateurs différents sont ainsi activés dans les cellules des territoires des myotomes. Les futurs myoblastes synthétisent activement les ARN-m et les protéines régulatrices soit de *MyoD* dans les myoblastes des territoires de muscles des membres, soit de *Myf-5* dans ceux des muscles dorsaux. Ces protéines régulatrices entretiennent la transcription de leurs propres ARN-m à l'intérieur des myoblastes. Tandis que les myotubes se forment, elles induisent l'expression de deux autres gènes régulateurs de la même famille, *myogénine* et *MRF4* dont les ARN-m puis les protéines seront donc détectables dans les myotubes. À leur tour, ces protéines régulatrices, combinées à d'autres facteurs, réguleront la transcription des ARN-m des protéines musculaires, actine, myosine, etc. Deux heures après le début de l'accumulation de MyoD, apparaissent, chez le xénope, les premiers ARN-m codant pour l' α -actine musculaire.

En résumé

Cet examen rapide de l'expression des principaux gènes régulateurs de la myogenèse nous a permis d'illustrer le fait qu'il existe un lien entre l'action d'inducteurs et l'expression de gènes tardifs. Nous avons retrouvé des inducteurs actifs depuis le début du développement et constaté que leur action se poursuit au-delà de cette étape du développement. Ce mécanisme où se succèdent induction, dé-répression d'un gène, synthèse d'une nouvelle protéine régulatrice, elle-même inductrice, se retrouve dans d'autres organogenèses : il aurait pu être développé avec les cristallines dans la différenciation de l'œil, par exemple (voir chap. 15). On a pu suivre la réduction des aires de synthèse d'une protéine, en liaison avec la délimitation et la spécialisation progressive des ébauches où cette protéine aura une fonction très précise, ce qui illustre de nouveau la notion de compétence de tissus embryonnaires permettant d'accéder à une différenciation donnée.

16.3 EFFETS RÉGULATEURS DU CYTOPLASME SUR L'EXPRESSION DES GÈNES

Les noyaux des blastomères d'un embryon se trouvent dans des milieux cytoplasmiques diversifiés. Les gènes sont activés par des protéines régulatrices provenant de ces cytoplasmes ; les protéines nouvelles qui sont alors synthétisées peuvent différer d'un blastomère à l'autre, ce qui contribue à accentuer la diversification chez les cellules filles. On peut cependant maintenir l'état pluripotent de cellules embryon-

naires en appliquant des techniques qui empêchent l'expression de facteurs de différenciation dans le cytoplasme. C'est par exemple le cas des cellules souches embryonnaires dites cellules ES (voir § 16.5).

16.3.1 Recyclage d'un noyau somatique greffé par un cytoplasme ovocytaire

Les noyaux greffés proviennent de cellules issues de tissus différenciés d'adultes ou de têtards dont les activités mitotiques et l'activité de transcription des ARN sont connues (voir encart 16.1).

Il apparaît dans tous les cas que ces noyaux modifient ces activités pour se conformer à celles de la cellule hôte qui peut être un ovocyte en croissance, où les synthèses d'ARN sont actives, un ovocyte mûr où ces synthèses ont cessé, un œuf fécondé où l'ADN se duplique.



ENCART 16.1 Historique des premières expériences de greffes nucléaires

Des expériences de transplantation de noyaux provenant de cellules adultes dans des œufs d'Amphibiens permettent de montrer que non seulement l'activité des gènes est sous le contrôle de composants du cytoplasme, mais aussi qu'un nouvel environnement cytoplasmique permet de modifier profondément les synthèses nucléaires. L'idée d'une telle expérience a été émise pour la première fois par Yves Delage, en 1903, et les premières tentatives de transplantation réalisées sans succès par Jean Rostand, en 1943 et 1946. Briggs et King obtiennent les premiers résultats en 1952 chez la grenouille *Rana pipiens* avec le développement de 27 têtards sur 104 œufs transplantés, en implantant des noyaux de cellules de blastula dans des ovocytes. Avec des noyaux prélevés plus tardivement, le taux de réussite diminue et devient nul à partir de prélèvements effectués au stade bourgeon caudal. D'après la méthode de Briggs et King (1952), la vésicule germinative d'un ovocyte est détruite par irradiation du pôle animal aux ultraviolets ou extraite chirurgicalement à l'aide d'une aiguille de verre. Les cellules des tissus donneurs (blastula ou cellules épithéliales d'un tissu différencié) sont dissociées dans l'EDTA¹ qui agit sur le ciment intercellulaire. Leurs noyaux sont obtenus en aspirant les cellules à l'aide d'une micropipette d'un diamètre égal à celui du noyau, de telle façon que la cellule se déchire et que seul passe le noyau. Celui-ci est alors injecté dans l'œuf énucléé. Ces expériences furent reprises plus tard notamment par Gurdon (1968) sur le xénope.

a) Contrôle du noyau greffé par le cytoplasme ovocytaire

Des noyaux isolés de cellules de rein de xénope adulte sont injectés dans des ovocytes énucléés d'une autre espèce, le pleurodèle (De Robertis et Gurdon, 1977). Les protéines synthétisées sont comparées à celles que synthétise un ovocyte de pleuro-

1. EDTA : Ethylene-Diamine-Tetracetic-Acid, chélateur de cations divalents.

dèle témoin. Le choix d'espèces différentes permet de distinguer à partir d'extraits, par électrophorèses bidimensionnelles, les taches formées par les protéines de l'ovocyte receveur (pleurodèle) et celles qui sont formées par les protéines traduites à partir du génome du donneur de noyau (xénope). Les noyaux greffés gonflent et, au bout de quelques heures, des protéines nouvelles sont détectées par les électrophorèses bidimensionnelles. Ce sont toutes des protéines habituellement synthétisées par un ovocyte de xénope, ce qui signifie que le noyau transplanté (rein de xénope) a été recyclé par son nouvel environnement cytoplasmique pour transcrire des ARN ovocytaires de xénope qui sont ensuite traduits en protéines. On n'a jamais observé d'activité de transcription spécifique d'un rein.

b) Reprogrammation des noyaux greffés

Les gènes tardifs exprimés dans les noyaux des cellules donneuses, après avoir été réprimés lors de la greffe, sont reprogrammés par le cytoplasme de certaines cellules hôtes.

Lors, par exemple, de la transplantation dans un œuf énucléé du noyau d'une cellule musculaire, les gènes de l' α -actine musculaire sont réprimés. Ils s'expriment à nouveau dans le mésoderme somitique, chez la gastrula âgée. En effet, seul le cytoplasme des cellules de cette ébauche contient les protéines régulatrices nécessaires pour activer ces gènes, les ébauches ayant subi les inductions nécessaires au début de la myogenèse, vu §16.2.2 (Gurdon et coll., 1984).

16.3.2 Cytoplasme et activation des gènes chez l'embryon

Une grande partie des gènes activés à la mi-blastula ne fait que contribuer à renouveler les ARN-m transcrits pendant l'ovogenèse. En effet, les facteurs régulateurs du cytoplasme des cellules de la blastula sont pour une part importante hérités du cytoplasme de l'ovocyte. Ces mêmes facteurs régulateurs conduiraient aussi à lever les répressions des gènes du noyau spermatique suivant un programme proche de celui de l'ovocyte.

Cette interprétation qui est fondée sur des observations réalisées chez l'oursin et de nombreuses espèces de Vertébrés n'est pas valable pour les Mammifères. On a montré chez la souris que les activités géniques des pronuclei mâle et femelle ne sont pas équivalentes. Pendant la gamétogenèse, il y aurait une «éducation» différente des génomes mâle et femelle.

16.3.3 L'empreinte génomique

Pour certains gènes, une seule des deux copies s'exprime, et son origine, paternelle ou maternelle, n'est pas indifférente. La répression programmée de gènes de l'un ou l'autre sexe est appelée **empreinte génomique (ou parentale)**. Elle s'observe chez tous les Mammifères placentaires selon un haut degré de conservation ; c'est ainsi qu'on constate entre l'homme et la souris, une large identité des gènes soumis à l'empreinte. Celle-ci est liée, chez les Vertébrés, à des modifications épigénétiques de l'ADN telle que la **méthylation des cytosines en 5-méthylcytosines** qui est

transmissible de génération en génération cellulaire et qui inhibe l'expression des gènes. Ainsi chez l'individu, pour un gène donné soumis à l'empreinte génomique, l'allèle méthylé hérité de l'un des parents est silencieux, cependant que l'autre non méthylé hérité de l'autre parent s'exprime.

Les défaillances dans ce fonctionnement sont à l'origine de pathologies, l'organisme se comportant pour chacun de ces gènes comme un organisme haploïde, son défaut de fonctionnement ne peut être compensé. À titre d'exemple, chez la souris, les gènes codant pour *Igf2* (pour « Insulin-like growth factor 2 ») et pour le récepteur *Igfr2* ne sont exprimés qu'à partir respectivement, des allèles paternel et maternel (De Chiara et coll., 1991, Barlow et coll., 1991). L'inactivation du gène *Igf2* provoque un défaut de croissance embryonnaire et fœtale cependant que celle de *Igf2r* entraîne un excès de poids chez l'embryon et le fœtus. Il a été montré expérimentalement que l'expression paternelle de *Igf2* promeut bien la croissance embryonnaire tandis que 3 gènes d'expression maternelle, *Igf2r*, *H19* et *Grb10* réduisent cet effet. Le bon fonctionnement du système *Igf2/Igfr2* dépend d'un ensemble de régulations complexes dans lequel interviennent des méthylations des gènes parentaux. Si une délétion affecte le chromosome maternel, la teneur en *Igf2* ne sera plus régulée, la taille du fœtus sera excessive et il mourra en fin de gestation.

On estime qu'il existe de 100 à 1000 de ces gènes soumis à empreinte chez les Mammifères ; environ 70 d'entre eux sont identifiés chez la souris.

L'empreinte génomique disparaît dans les cellules germinales primordiales du jeune embryon lors de la formation de sa lignée germinale où toute méthylation est levée. Plus tard, lorsque cette lignée se différencie suivant une spermatogenèse chez le fœtus mâle ou une ovogenèse chez le fœtus femelle, un nouveau profil de méthylation du sexe mâle ou du sexe femelle se met en place.

Chez des embryons expérimentaux monoparentaux équipés de deux génomes mâles (androgénétiques) ou deux génomes femelles (gynogénétiques), les régulations dues à l'empreinte parentale ne fonctionnent pas et la survie n'est que de quelques jours. Les anomalies de développement sont majeures mais ne sont pas de même type dans l'un ou l'autre cas. **L'empreinte génomique observée chez les Mammifères empêche chez ces derniers toute possibilité de parthénogenèse.**

16.3.4 Échange de protéines entre noyau et cytoplasme

Les noyaux greffés qui sont soumis à une nouvelle programmation de leur activité sont le site d'échanges importants de protéines avec le cytoplasme hôte.

Le passage de protéines du noyau greffé vers le cytoplasme récepteur a été démontré en faisant incorporer des acides aminés tritiés par les tissus donneurs avant le prélèvement des noyaux. Des protéines nucléaires incorporent ces précurseurs ; suivant la nature des acides aminés incorporés, on marque de préférence les histones constitutives de la chromatine ou les protéines mobiles du noyau, notamment les protéines régulatrices. Les noyaux à greffer proviennent de cellules endodermiques de cellules de blastula ou de gastrula ; ils sont injectés dans des ovocytes ou des œufs fécondés.

Des histoautoradiographies permettent de suivre les protéines marquées. On constate que **les histones restent dans les noyaux greffés**, tandis que **les protéines acides** marquées avec des acides aminés aromatiques **migrent rapidement dans le cytoplasme**.

On a montré que des protéines nucléaires injectées dans un ovocyte migrent dans la vésicule germinative et s'y concentrent. Le cheminement de l'une d'elles, la **nucléoplasmine**, a été suivi en l'injectant dans le cytoplasme après l'avoir marquée par des particules d'or colloïdal. Elle est transportée dans le noyau à travers les pores nucléaires. Par contre, les protéines non nucléaires ne pénètrent pas dans le noyau, à l'exception de certaines de faible poids moléculaire. On peut considérer que des mouvements analogues se produisent du cytoplasme receveur vers les noyaux greffés.

Nous avons rencontré plus haut d'autres exemples de migrations de protéines régulatrices vers le noyau :

- chez la drosophile, la polarité dorso-ventrale de l'embryon est liée à la protéine régulatrice Dorsal. Celle-ci est en quantité égale dans toutes les cellules du blastoderme, mais inégalement répartie entre les noyaux et le cytoplasme. Lorsqu'elle est présente dans les noyaux, les ébauches donnent des structures ventrales ; lorsqu'elle est localisée dans le cytoplasme, les ébauches forment des structures dorsales (voir § 3.5.4e, 11.2.2 et fig. 3.13);

- dans la blastula de xénope, la β -caténine est un facteur de transcription qui s'accumule dans l'aire dorso-végétative dès la fécondation. On a suivi son passage dans les noyaux des cellules du centre de Nieuwkoop où elle régule l'activité d'autres gènes régulateurs (voir § 12.5.6).

16.3.5 Étude des potentialités des noyaux des cellules somatiques par la technique des greffes nucléaires chez les Amphibiens

Si la combinaison du cytoplasme de l'œuf énucléé avec le noyau transplanté peut se développer en un embryon possédant tous les types cellulaires, c'est que le noyau transplanté n'avait pas perdu les potentialités qu'il n'exprimait pas dans la cellule d'origine.

Après transplantation de noyaux de blastula, les embryons se développent suivant un pourcentage élevé dans de nombreuses espèces où l'expérience a été tentée. Les noyaux de blastula ont en effet conservé une activité mitotique intense et appartiennent à des tissus à peine déterminés. Les noyaux d'une même blastula greffés dans plusieurs œufs activés et énucléés permettent d'obtenir des «jumeaux» vrais, aux propriétés immunitaires identiques chez le pleurodèle (Gallien et Aimar, 1971), malgré la diversité des cytoplasmes ovocytaires.

La transplantation de noyaux provenant de donneurs ayant dépassé le stade de la jeune gastrula montre que les noyaux greffés s'acclimatent de plus en plus difficilement chez la plupart des espèces.

C'est chez le xénope que les transplantations nucléaires réalisées par Gurdon à partir de 1962, ont permis d'obtenir des résultats plus satisfaisants, les noyaux des cellules somatiques de cette espèce conservant leur totipotence plus longtemps. Les noyaux de cellules du mésoderme ou de l'endoderme de neurula, de l'endoderme de bourgeon caudal ont permis, après leur transplantation dans l'ovocyte, le développement des individus jusqu'à l'état adulte. Des greffes de noyaux de cellules provenant de tissus différenciés prélevés avant la métamorphose, comme les reins, cœur, cerveau ou cellules sanguines, etc. ont permis des développements qui ne dépassaient pas le stade du têtard nageant. Les cellules de l'épithélium intestinal de têtard ont quant à elles fourni des noyaux qui ont permis, dans un faible pourcentage (1,4% sur 727 greffes) le développement complet de têtards, et même 7 métamorphoses.

En prélevant des noyaux de cellules provenant de tissus d'adultes, d'autres procédés destinés à réactiver ces noyaux ont encore amélioré ces résultats. Des noyaux prélevés à partir de cellules épithéliales de peau d'adulte sont par exemple greffés dans des ovocytes et permettent d'obtenir des gastrulas ; les noyaux de ces mêmes gastrulas, prélevés et greffés à leur tour permettent d'obtenir des têtards et des adultes normaux. Quelle que soit l'espèce, la létalité est énorme chez les embryons provenant d'un œuf à noyau transplanté. L'expérience démontre cependant que les noyaux somatiques de tissus différenciés, et *a fortiori* d'embryons âgés, peuvent recouvrer une certaine totipotence et permettre le développement jusqu'à l'état adulte.

Les noyaux de cellules différenciées n'auraient donc pas perdu de gènes. Les causes de cette létalité importante sont dues à des caryopathies résultant de l'impossibilité pour les noyaux, même s'il s'agit de noyaux réputés pluripotents comme ceux des cellules germinales, de recycler leurs protéines structurales et régulatrices tandis qu'ils sont induits à se diviser activement. La réplication des chromosomes, dans les deux ou trois heures après l'implantation, comporte de nombreuses erreurs, ce qui entraîne un développement abortif.

En résumé

Les échanges de protéines entre un noyau transplanté dans un ovocyte (ou un œuf fécondé) et le cytoplasme environnant fournissent une image des échanges qui surviennent dans les conditions naturelles de développement. Dans un développement normal, le nombre des protéines régulatrices connues, résultant d'expressions de gènes homéotiques, de gènes Pax, de *MyoD*... augmente sans cesse et l'on connaît de mieux en mieux leurs rôles. Chaque territoire embryonnaire, chaque ébauche possède sa panoplie spécifique de protéines régulatrices.

Un noyau somatique greffé montre une certaine réversibilité dans sa spécialisation. Ira-t-elle jusqu'à retrouver la totipotentialité d'un noyau de fécondation? Des travaux réalisés dans les trente dernières années sur les Amphibiens ont apporté des réponses positives partielles. Elles ont ouvert la voie aux greffes nucléaires réalisées chez des Mammifères.

16.4 CLONAGE PAR TRANSPLANTATION DE NOYAUX SOMATIQUES DANS DES OVOCYTES DE MAMMIFÈRE

Depuis les résultats obtenus sur les Amphibiens, la technique des greffes nucléaires dans un ovocyte énucléé a été mise au point chez les Mammifères (voir encart 16.2). Les chercheurs poursuivent deux buts différents : 1) – obtenir des animaux génétiquement identiques au donneur de noyau ; c'est le clonage reproductif que nous développons ici, 2) – obtenir des lignées de cellules multipotentes qui pourraient être utilisées dans un but thérapeutique, notamment par la réalisation de greffes qui seraient tolérées par leur receveur qui serait également donneur du noyau greffé : c'est le clonage thérapeutique qui n'entre pas dans notre sujet.



ENCART 16.2 Technique de clonage

La méthode a été mise au point pour les brebis. Des ovulations sont provoquées chez des brebis d'une variété donnée, par injection de gonadotrophine hypophysaire. Les noyaux des ovocytes en métaphase de seconde division de méiose sont prélevés avec une micropipette. Une cellule somatique provenant d'un individu d'une autre variété est ensuite injectée sous la zone pellucide de l'ovocyte énucléé. L'opération est réalisée à l'aide de micromanipulateurs sous microscope. La rupture de la membrane de la cellule somatique et la fusion de cette membrane avec celle de l'ovocyte sont provoquées par un choc électrique qui active également l'ovocyte, comme l'aurait fait la pénétration du spermatozoïde. On peut considérer comme négligeables les éléments cytoplasmiques de la cellule injectée, le volume de l'ovocyte étant quelques centaines de fois plus important.

Avant d'être implantées, les cellules somatiques se sont multipliées en culture *in vitro*, puis ont été placées en un milieu appauvri, où elles entrent en repos (phase G0). Après greffe du noyau et activation, les ovocytes greffés sont placés dans l'oviducte d'une première brebis, séjour conforme aux conditions d'un développement normal au cours duquel ils se divisent et évoluent en blastocystes ; l'oviducte est ligaturé de telle façon que ces derniers ne peuvent s'implanter dans la muqueuse utérine. On prélève ensuite les blastocystes, en vérifiant que le développement débute et on n'implante que des embryons en bonne voie de développement dans l'utérus d'une seconde brebis, la « mère porteuse ». Les porteuses appartiennent à une variété différente de celle du donneur de noyaux, de façon à éviter toute erreur quant à l'origine du nouveau-né. Des contrôles sont effectués après la naissance pour vérifier l'identité du génome du nouveau-né et de la donneuse de noyau.

En clonage reproductif, après de nombreux essais, les premiers succès ont été obtenus sur des animaux d'élevage, brebis puis vache, respectivement en Ecosse, (Wilmut, Campbell et coll., 1996) et en France, (Renard et coll., 1998). Ces espèces présentent un intérêt économique ; elles ont aussi l'avantage d'avoir des ovocytes dans lesquels les transcriptions d'ARN ne reprennent que quelques jours après la fécondation. Un noyau somatique transplanté bénéficie du même temps de latence.

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

Dans une expérience utilisant des cellules d'un **blastocyste** comme source de noyaux, huit nouveau-nés (sur 45 implantations) ont été obtenus, normalement développés, dont 2 ont survécu. Un an plus tard, ces chercheurs obtiennent une brebis, « **Dolly** », viable et même féconde. Elle doit sa célébrité au fait que la cellule donneuse de noyau est une **cellule somatique adulte**, cellule de glande mammaire de brebis gestante. La même publication fait état de 7 autres réussites enregistrées en utilisant comme donneuses de noyaux des cellules embryonnaires : des fibroblastes d'embryon de 9 jours et des cellules d'embryons de 26 jours. Chez les bovidés, deux génisses et deux veaux nés viables ont été obtenus avec des greffes de cellules différenciées de peau et de muscle, d'origine fœtale (Renard et coll., 1998). Plus récemment, des porcs ont été clonés à partir de cellules de la granulosa d'une truie adulte utilisées comme donneuse de noyaux. Sur 72 implants, cinq ovocytes greffés se sont développés jusqu'à terme (Polojaeva et coll., 2000).

Enfin, un premier succès vient d'être obtenu sur un Primate, le macaque (Byrne et al. 2007), avec la création par clonage de deux lignées de cellules souches issues de deux ovocytes (pour 304 ovocytes prélevés). Il ne s'agit pas de clonage reproductif, les blastocystes issus d'ovocytes greffés n'ayant pas été réimplantés.

a) La qualité des cellules donneuses est déterminante

Le taux de réussite est d'autant plus faible que la cellule donneuse de noyau est plus différenciée. Il reste de l'ordre de 2 %, quelle que soit l'espèce utilisée.



La brebis Dolly est la rescapée de 277 embryons réimplantés après greffe ; les noyaux greffés proviennent de tissu d'adultes, mais qui se divisent activement. Les embryons dont le noyau de substitution provient de cellules fœtales fibroblastiques ont donné 3 jeunes pour 172 implantations ; ceux dont le noyau provient de cellules d'embryons de 26 jours, 4 pour 385. Chez la vache, le pourcentage de réussite avec des cellules fœtales reste également faible.

De façon générale, des noyaux de cellules provenant d'un tissu en croissance, qu'il soit fœtal ou adulte, et dont certaines cellules sont encore peu différenciées, donnent des animaux viables. On ne peut affirmer alors qu'un clone provient d'une cellule différenciée. En revanche, l'échec a été total dans des essais de clonage à partir de certaines cellules complètement différenciées, comme des cellules de Sertoli et des cellules nerveuses de souris, ou des kératinocytes chez la vache. Les cellules de la granulosa de vache ou de souris, aussi différenciées que les précédentes, sont pour leur part propices au clonage.

Dans la plupart des cas, les expérimentateurs utilisent des cellules en culture ; ce sont essentiellement des fibroblastes. La durée des cultures ne semble pas altérer la qualité des noyaux donneurs, des bovins viables ayant été obtenus dans l'équipe de Renard à partir de cultures proches de la sénescence.

b) L'âge des donneurs pourrait jouer un rôle

Les animaux obtenus sont identiques au donneur du noyau greffé. Toutefois, on peut craindre que cette identité ne s'étende à l'âge des noyaux des cellules du clone, ceux-ci portant les marques de l'âge du donneur, ce qui aboutirait à des vieillisse-

ments précoces des clones. En effet, l'activité des télomérases, enzymes réparatrices des extrémités des chromosomes après chaque mitose, diminue avec l'âge d'un individu. Lorsqu'un noyau somatique est prélevé chez un adulte, il semble bien transmettre à son hôte un niveau d'activité télomérasique en rapport avec son âge, et donc plus faible que celui d'un nouveau-né normal. Ces caractéristiques de noyaux prématurément vieillis affecteraient la longévité des animaux issus du clonage. Cette interprétation est actuellement contestée. Chez les bovins, l'âge des donneurs ne semble pas être déterminant ; des chercheurs ont obtenu des clones viables à partir de taureaux donneurs de 17 et 21 ans et les études cytologiques n'ont pas permis de déceler de raccourcissement au niveau des télomères. Il est difficile, dans l'état actuel des connaissances, d'établir une règle générale en ce domaine. Une autre cause de ces échecs proviendrait d'erreurs de déprogrammation et de reprogrammation du matériel génétique issu du noyau donneur.

c) Nécessité de synchronisation entre noyau greffé et cytoplasme receveur

Nous avons décrit l'état dans lequel se trouve le cytoplasme d'un ovocyte ayant subi la maturation (voir § 3.4.2). Le MPF cytoplasmique peut provoquer une duplication immédiate de l'ADN, plus rapide que dans une cellule somatique, et l'ADN copié risque de présenter des anomalies, d'autant plus qu'on ne sait pas exactement dans quelle phase du cycle cellulaire pourrait se trouver le noyau greffé.



On a tenté d'éliminer l'obstacle de l'asynchronisme de plusieurs façons. Par exemple, un choc électrique subi par l'ovocyte avant l'injection permet d'éliminer l'activité du MPF. La cellule en culture est alors implantée sous la zone pellucide et sa fusion avec l'ovocyte est provoquée par un second choc électrique ; dans ces conditions, la réplication de l'ADN n'est pas engagée brutalement. Une seconde méthode, plus efficace, a consisté à appauvrir le milieu de culture des cellules prélevées, qui entrent ainsi en G0. Lorsqu'elles sont injectées sous la zone pellucide d'un ovocyte où l'activité du MPF est intacte, un choc électrique unique suffit à la fusion des membranes cellulaires et à l'activation de l'œuf. Le noyau implanté qui est en G0 passe normalement par toutes les phases du cycle cellulaire avant de se diviser, les échanges de protéines nucléaires peuvent alors se dérouler dans des conditions favorables et les risques d'anomalies de duplication se trouvent réduits. (Toutefois, chez la vache, le même pourcentage de blastocystes en état d'être implantés (3 à 8 %) est obtenu avec des noyaux issus de cellules quiescentes ou en multiplication.)

d) La déprogrammation du noyau différencié

Toute cellule différenciée spécialise le fonctionnement de ses gènes en mettant en sommeil ceux d'entre eux qui sont inactifs dans ce type cellulaire. Il existe plusieurs mécanismes d'inactivation ; l'un des plus probables est le degré de méthylation de l'ADN (voir 16.3.3).

Chez l'embryon de souris normal, grâce à l'emploi d'anticorps qui se fixent sur les zones méthylées de l'ADN, on a pu suivre l'évolution du taux de méthylation de l'ovocyte, du spermatozoïde et des premiers blastomères. Dans les expériences

de clonage, on constate que les noyaux n'évoluent pas comme ceux d'un embryon normal, mais gardent dans bien des cas un profil de méthylation qui ressemble à celui de la cellule donneuse adulte. La reprogrammation génétique via la méthylation est souvent aberrante, ce qui expliquerait les nombreux échecs précoces dans le clonage ; chez les individus viables, des malformations fréquentes pourraient s'expliquer aussi par une dérégulation de gènes peut-être associée à un problème de méthylation.

Cette reprogrammation via la méthylation est très irrégulière d'une expérience à l'autre ; il existe d'autres mécanismes de régulation génique qui ne seront pas abordés ici.

Un autre facteur d'échec précoce peut aussi résulter de perturbations graves dues à l'acte mécanique de la greffe susceptible de modifier l'architecture du cytoplasme de l'ovocyte et la répartition des déterminants qu'il contient (voir § 3.6.2).

En résumé

Le clonage permet de montrer que le noyau est porteur du génome de l'espèce et semble le rester sans perte de potentialités, même dans une cellule différenciée. Le réveil de ces potentialités est cependant difficile. Il démontre aussi que **seul un cytoplasme ovocytaire est équipé pour réguler correctement un programme génétique et en assurer l'exécution**. Bien des inconnues subsistent d'ailleurs quant à la connaissance des informations que contient ce cytoplasme. Il faut rappeler que la conformité du clone avec le donneur de noyau ne peut être complète. En effet, les ADN mitochondriaux ne sont pas ceux du donneur, mais appartiennent à l'ovocyte receveur. Tout caractère dépendant de l'expression de ces gènes sera différent.

Les noyaux des cellules d'un embryon jeune reviennent plus aisément à l'état totipotent que ceux des cellules adultes, qu'il s'agisse d'Amphibiens ou de Mammifères. Chez ceux-ci, le recyclage de cellules adultes n'obéit pas à des règles générales ; il est favorisé dans des noyaux provenant de cellules en culture ou de cellules où les mitoses sont actives. Dans le cas de la brebis Dolly, le noyau greffé adulte provenait de tissus où l'activité mitotique était intense : glande mammaire de femelle en gestation.

Le clonage thérapeutique présente des caractères différents. On ne pratique pas de réimplantation dans un utérus porteur. Ne sont utilisées que les cellules du bouton embryonnaire du blastocyste comme source de cellules souches génétiquement identiques aux tissus du donneur du noyau greffé.

Si les cellules issues du clonage thérapeutique étaient employées pour soigner certaines pathologies, la compatibilité entre cellules greffées et receveur également donneur du noyau serait acquise. Le champ d'action de cette technique exclurait cependant les maladies génétiques. En effet, les noyaux greffés porteraient la même anomalie que les tissus du receveur, à moins que le site du gène déficient ait été auparavant identifié et réparé. La thérapie des maladies auto-immunes ne peut pas non plus recourir à ces greffes, le malade réagirait sans doute contre le greffon qu'il reconnaîtrait comme « soi » ; ce pourrait être le cas du diabète de type I.

16.5 CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

Une dernière manière d'étudier l'expression du génome embryonnaire est de disposer de cellules restant indifférenciées mais susceptibles de maintenir *in vitro* la capacité de pouvoir s'engager dans n'importe quelle voie de différenciation. Cette voie a suscité de nombreux travaux dès les années 70. Ils portaient alors sur les tératocarcinomes murins, tumeurs apparaissant spontanément au niveau des gonades de certaines souches de souris et qui se manifestent sous la forme d'amas de cellules différenciées organisées de façon anarchique.

Ces travaux ont conduit ensuite à l'étude de cellules issues d'embryons précoces de Mammifères, notamment de la masse cellulaire interne du blastocyste de souris. Elles ont fourni, en 1981, des cellules capables de proliférer indéfiniment *in vitro* tout en conservant une totipotentialité de différenciation. Ces **cellules souches embryonnaires** (ou **cellules ES**, pour « Embryonic Stem cells »), ont été isolées et caractérisées chez les Primates, dont l'homme (Thompson et coll., 1998).

L'étude du comportement de ces cellules a permis de mettre en évidence l'importance de la nature et de la séquence des signaux reçus par les cellules pour que celles-ci restent indifférenciées ou s'engagent dans des voies spécifiques de différenciation.

D'un point de vue terminologique, il convient de faire la distinction entre **cellules souches totipotentes**, cellules qui individuellement sont capables de donner naissance à un individu complet (c'est le cas de l'œuf fécondé et de blastomères provenant des toutes premières divisions de segmentation), **cellules souches pluripotentes**, cellules qui sont susceptibles de donner tous les types cellulaires de l'organisme (c'est le cas des cellules ES réimplantées dans un blastocyste), et **cellules souches multipotentes** que l'on trouve à l'état adulte et qui correspondent à des cellules à partir desquelles se différencie un nombre restreint de lignées cellulaires (c'est le cas par exemple des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse)

16.5.1 Mécanisme du maintien de l'état pluripotent indifférencié

a) Rôle des protéines Polycomb

Les gènes organisateurs du développement ne s'expriment pas dans les cellules souches. Ce silence est le résultat de l'activité de gènes qui codent pour des protéines régulatrices inhibant leur expression : les **protéines Polycomb**. Celles-ci inhibent l'expression des gènes organisateurs et des facteurs de transcription qui régulent les gènes du développement dans les cellules souches embryonnaires. Parmi les gènes bloqués par Polycomb se trouvent ceux codant pour des facteurs de transcription essentiels pour le maintien de la pluripotence des cellules souches, comme **Oct4**, **Sox2** et **Nanog**. Ils sont donc à la fois neutralisés et préparés pour l'activation (Boyer et coll., 2006, Irotta, 2006).

Les protéines Polycomb ont d'abord été reconnues chez la drosophile. Elles sont essentielles au bon déroulement des phases précoces du développement chez tous

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

les Métazoaires en régulant notamment l'expression des gènes homéotiques. Elles forment des complexes multimériques appelés PRC (pour « Polycomb Repressive Complex ») qui, en se fixant sur l'ADN au niveau de séquences régulatrices de gènes cibles, répriment l'expression de ces derniers. L'identité des cellules peut être ainsi stabilisée par suite de la répression de gènes qui doivent être silencieux au stade du développement considéré.



La cartographie de la distribution d'un des complexes Polycomb (PRC2) dans le génome humain montre que ceux-ci sont distribués sur 200 gènes codant pour des régulateurs clés du développement (512 chez la souris pour les régulateurs PRC1 et PRC2). Ces gènes réprimés se trouvent dans des nucléosomes triméthylés au niveau de la lysine 27 de l'histone H3. Ces mêmes gènes cibles de Polycomb seront préférentiellement activés pendant la différenciation cellulaire au cours d'un développement normal. Dans des cellules déficientes pour un composant de PRC2, les gènes cibles sont dé-réprimés précocément et, activés préférentiellement, provoquant une différenciation cellulaire anormale (Boyers et coll., 2006).

b) Rôle des protéines Oct4, Sox2 et Nanog dans la régulation de la pluripotence cellulaire

Parmi les gènes impliqués dans la régulation de la pluripotence cellulaire, *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* jouent un rôle essentiel. On a montré, chez la souris comme chez l'homme, que les produits de ces gènes agissent en synergie tout en observant une certaine hiérarchie dans leur intervention et se lient aux promoteurs de gènes qu'elles bloquent. Très récemment, un quatrième facteur dénommé **Ronin** a été découvert, capable d'exercer épigénétiquement, dans les cellules ES, une puissante répression des gènes impliqués dans la différenciation (Dejosez et coll., 2008)

Chez les Mammifères, *Oct4* s'exprime dans le bouton embryonnaire et dans l'épiblaste, jusqu'à la gastrulation. Il ne s'exprime plus ensuite que dans la ligne primitive, mais disparaît dans les cellules qui ont subi l'induction mésodermique (Yeom et coll., 1991, Yoshima et coll., 1999). Des embryons déficients (*Oct4*^{-/-}) disparaissent au stade de l'implantation car les cellules du bouton embryonnaire se différencient en trophoblaste (Nichols et coll., 1998).

Dans la lignée germinale, *Oct4* est également exprimé (Kehler, 2004) mais son activité cesse quand les cellules évoluent en ovocytes ou en spermatozoïdes.

Oct4 régule donc des programmes qui maintiennent l'état indifférencié et la pluripotence des cellules jusqu'à ce qu'elles reçoivent les informations extérieures d'une induction. Ses gènes cibles contiennent une région régulatrice avec un octamère capable de lier *Oct4*.



On a pu montrer la large gamme d'action de *Oct4* dans une lignée de cellules souches en utilisant la technique d'ARN inverse neutralisant l'expression de ce gène. C'est ainsi qu'on a constaté l'altération de l'expression de plus de 1000 gènes régulés positivement par *Oct4*, comme *Nanog*, *Sox2*, etc., ou négativement, comme *BMP4*, *Brachyury*, etc., ainsi que l'altération de l'expression de gènes cibles de *Sox2* et de *Nanog*. Ces

résultats incluent aussi des régulateurs des gènes *BMP*, *FGF*, *WNT* et de l'*activine*, ainsi que de nombreux gènes intervenant dans le remodelage de la chromatine, l'apoptose et la différenciation du trophoblaste humain, etc. (Baborie et coll., 2006).

Il existe chez les Vertébrés anamniotes des mécanismes semblables qui permettent d'éviter une différenciation cellulaire précoce. Chez le xénope, par exemple, les cellules du futur ectoderme et de la zone marginale ventrale restent avec de relativement larges potentialités jusqu'à la gastrulation tardive. On y a identifié des facteurs de transcription comme Nanog et Oct4 et d'autres éléments nécessaires au maintien de la pluripotence comprenant la cytokine LIF (pour « Leukemia inhibitory factor »), comme chez la souris, et BMP4 (Chambers, 2004).

Les cellules peuvent s'engager dans des voies de différenciation par l'ajout et/ou le remplacement séquentiel de divers facteurs de croissance (FGF, EGF...) dans le milieu de culture, ce qui entraîne la sélection de populations pures de cellules pluripotentes. Chez la souris, par exemple, on obtient en absence du facteur LIF, des cellules précurseurs de cellules gliales, susceptibles d'évoluer ensuite en astrocytes ou en oligodendrocytes (Brustle et coll., 1999).

c) Rôle possible des divisions asymétriques des cellules souches

Selon certaines observations, lors de leur division, les cellules souches transmettraient à une seule des deux cellules filles les brins matrices d'ADN. Cette cellule deviendrait à son tour une cellule souche de réserve et ne serait pas porteuse d'erreurs ou de mutations ayant pu survenir lors de la replication. Les mécanismes de cette **co-ségrégation des brins matrices** mise en évidence par Cairns (1975) restent encore mal compris (reconnaissance des brins matrices au niveau des kinétochores par des constituants du cytosquelette fusorial et/ou liée à des marqueurs épigénétiques dus à des états de méthylation différents par exemple).

La généralisation de ce phénomène reste encore hypothétique, celui-ci ne pouvant peut-être se manifester que lors de certains états physiologiques et n'affecter que certains types cellulaires.

Les conditions conduisant à des distributions inégales de facteurs régulateurs cytoplasmiques (protéine Numb par exemple) et à la ségrégation différentielle des brins d'ADN lors des divisions asymétriques des cellules souches seront certainement l'objet d'études qui se développeront dans un avenir proche afin de connaître ce qui détermine une cellule à se différencier ou non.

16.5.2 Intérêts de l'étude des cellules souches

De nombreuses recherches sont actuellement engagées dans le but d'identifier les facteurs contrôlant le maintien ou la sortie de l'état cellulaire indifférencié, et de connaître le mode d'action. Leur utilisation pourrait offrir de nombreuses applications dans le domaine médical, notamment à des fins d'aide à la réparation tissulaire. A ce propos, l'identification dans l'organisme adulte (Jiang et coll., 2002) de

cellules de la moelle osseuse présentant des caractéristiques proches des cellules ES, les **cellules MAPC** (pour « **Multipotent Adult Progenitor Cell** ») est susceptible d'ouvrir à terme d'intéressantes perspectives thérapeutiques. De même, la pluripotentialité des spermatogonies humaines a été démontrée récemment, ce qui en ferait une source nouvelle de cellules souches (Conrad et coll., 2008). Enfin, les tout récents travaux qui ont permis l'obtention de cellules souches pluripotentes après reprogrammation de divers types de cellules somatiques différenciées ouvrent des champs d'applications très prometteurs (voir encart 16.3).

En recherche fondamentale, les cellules souches sont d'ores et déjà employées pour étudier l'expression génique par des méthodes de « knock out » notamment en utilisant des souris transgéniques. Ainsi, des cellules ES transfectées avec de l'ADN porteur d'un gène ayant subi une mutation ou une délétion peuvent être insérées dans des blastocystes de souris et s'intégrer parmi les cellules de la masse cellulaire interne. La souris chez laquelle ces blastocystes auront été implantés donnera naissance à des souris chimères porteuses de l'information génétique altérée. À la suite de croisements successifs, entre chimères et animaux sains tout d'abord, puis entre individus porteurs de la seconde génération, peuvent apparaître des homozygotes porteurs d'une double altération génique. La comparaison des caractères phénotypiques entre animaux sains et homozygotes permet d'évaluer les conséquences de l'altération de l'expression du gène étudié et d'apprécier ainsi son rôle dans des conditions physiologiques normales.



ENCART 16.3 Les cellules iPS, nouvelle source de cellules souches

Les cellules souches pluripotentes induites (ou **cellules iPS**) sont des cellules redevenues embryonnaires à la suite d'une reprogrammation *in vitro* de cellules adultes. Elle est réalisée en insérant dans les cellules en culture des gènes (liés à un rétrovirus pour assurer leur pénétration) qui interviennent dans le maintien de la pluripotence : *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* et *Klf4*. Ces premiers résultats ont été obtenus d'abord sur la souris (Takahashi et coll., 2007, Okita et coll., 2007), à partir de plusieurs types de cellules, et leur pluripotence acquise a été démontrée par leur aptitude à donner différents types cellulaires chez un embryon chimère ; ceux-ci sont confectionnés par la fusion de cellules de la lignée testée et de blastomères d'une souris normale. Plus récemment, cette reprogrammation aurait été réalisée sur des cellules humaines. Il faut noter que la technique devra encore être perfectionnée avant d'être utilisée dans des buts thérapeutiques ; certains gènes en effet, comme *c-Myc* sont des oncogènes, générateurs de tumeurs, et doivent être éliminés de cet ensemble. On notera qu'il s'agit des mêmes gènes qui ont été rencontrés dans l'étude des mécanismes qui maintiennent la pluripotence cellulaire chez des cellules indifférenciées (voir *supra*).

Questions

- 16.1** Les produits issus de l'activité transcriptionnelle embryonnaire sont-ils qualitativement très différents de ceux présents dans les ovocytes ?
- 16.2** Quels sont les types de molécules généralement synthétisées à partir d'ARN-m qualifiés de tardifs ?
- 16.3** À partir de quel stade du développement le fonctionnement du génome zygotique se manifeste-il chez les Amphibiens ?
- 16.4** Qu'ont révélé les premières expériences de greffe nucléaire pratiquées chez les Amphibiens ?
- 16.5** Pour quelle raison ne peut-on pas observer des cas de parthénogenèse chez les Mammifères ?
- 16.6** Quel concept nouveau a été révélé par l'expérience historique de clonage ayant donné naissance à la brebis Dolly ?
- 16.7** Définition des cellules ES
- 16.8** Les cellules de la masse cellulaire interne sont-elles totipotentes ?
- 16.9** Que désigne-t-on sous le terme de cellules multipotentes ?
- 16.10** Quels sont les gènes impliqués dans le maintien d'une pluripotence ?

Réponses page 393

DIFFÉRENCIATION DES GONADES ET DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

Médiation hormonale, déterminisme génétique

PLAN

- 17.1 Morphogenèse des gonades
- 17.2 Différenciation des conduits génitaux
- 17.3 Relations entre sexe génétique et différenciation sexuelle
- 17.4 Les hormones dans la différenciation sexuelle des Mammifères

La formation des **gonades** de Vertébrés, testicule ou ovaire, à partir d'ébauches neutres, est une organogenèse au cours de laquelle on peut successivement mettre en évidence l'activité de gènes régulateurs de la différenciation sexuelle mâle et femelle et le rôle d'hormones. Un gène de masculinisation a été identifié qui détermine notamment la différenciation des cellules somatiques de soutien en cellules de Sertoli. À la suite de la détermination génétique du sexe, les ébauches neutres se différencient, avec le concours d'autres gènes régulateurs, en un des deux types de gonades. Celles-ci sécrètent différentes hormones qui sont responsables de l'évolution des voies d'évacuation des produits génitaux (**tractus génitaux**) et de la différenciation des organes génitaux (**genitalia**) dans le sens mâle ou femelle.

17.1 MORPHOGENÈSE DES GONADES

Les gonades des Vertébrés sont formées à partir de trois constituants d'origines différentes : les **crêtes génitales** issues de l'épithélium cœlomique, le **blastème gonadique**, tissu mésenchymateux d'origine parfois difficile à établir et les **cellules germinales primordiales** ou **gonocytes primordiaux** d'origine extra-gonadique.

17.1.1 Les crêtes génitales et le blastème gonadique, éléments somatiques de la gonade

Les ébauches de gonades sont primitivement neutres, c'est-à-dire sexuellement indifférenciées. Elles sont d'abord représentées par les crêtes génitales issues d'un épaissement et d'un creusement de la somatopleure des lames latérales, de part et d'autre du mésentère dorsal (fig. 17.1).

17 • Différenciation des gonades et différenciation sexuelle

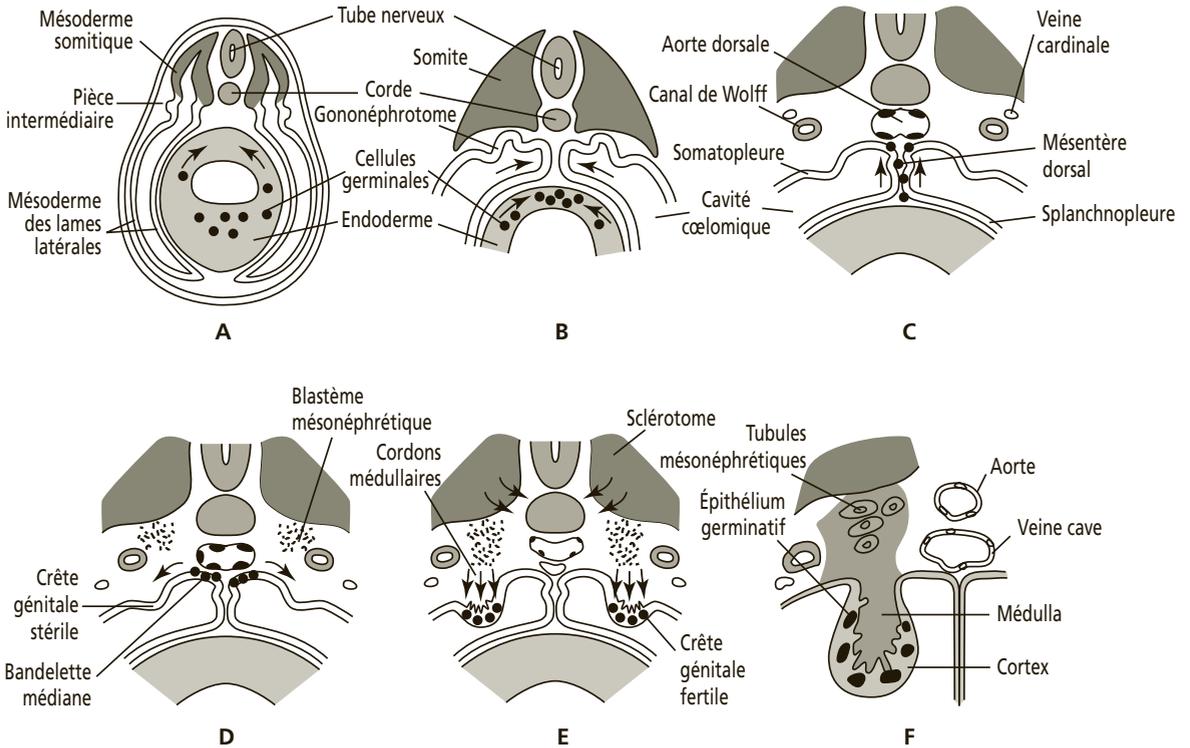


Figure 17.1 - Migration des cellules germinales primordiales et interprétation de la formation d'une gonade indifférenciée chez un Amphibien Anoure.

A, B : Migration des gonocytes primordiaux dans l'endoderme. **C :** Migration le long du mésentère dorsal. **D :** Formation d'une crête génitale impaire (bandelette médiane). **E :** Colonisation des crêtes génitales par les gonocytes et envahissement des cavités par du mésenchyme mésonéphrétique (cordons médullaires). **F :** Gonade indifférenciée avec une médulla mésenchymateuse d'origine mésonéphrétique et un cortex constitué par l'épithélium péritonéal somatique colonisé par les gonocytes (d'après Witschi).

Entre les crêtes génitales et les ébauches du mésonéphros issues du mésoderme des pièces intermédiaires, se mettent en place les blastèmes mésenchymateux gonadiques. Différentes interprétations sont formulées quant à l'origine des cellules somatiques constituant ces derniers. On constate une participation du mésonéphros (ou de son blastème) et/ou de l'épithélium péritonéal suivant des proportions qui diffèrent selon les taxons (voir § 17.1.4).

Les ébauches gonadiques sont au départ uniquement constituées par des cellules somatiques. De stériles, les crêtes génitales deviendront fertiles chez beaucoup d'espèces, lorsqu'elles auront été colonisées par les cellules germinales primordiales. Chez les Vertébrés, seule une région restreinte des crêtes génitales est colonisée, les autres régions dégénéralent ou se transformant en organe lymphoïde.

17.1.2 Les cellules germinales primordiales

a) Leur origine est extérieure à l'ébauche somatique

Les cellules germinales primordiales proviennent de régions de l'embryon différentes selon les espèces (voir § *infra*) et ce n'est qu'à la suite d'une migration qu'elles colonisent les crêtes génitales.

Leur origine a été montrée pour la première fois chez les Amphibiens Anoures (Bounoure, 1934). Au pôle végétatif de l'œuf indivis de grenouille existent, sous le cortex, des éléments cytoplasmiques basophiles associés à des mitochondries ; ils contiennent des ribonucléoprotéines. Ces éléments qui forment des îlots correspondent à des déterminants cytoplasmiques particuliers (voir § 3.6.2 et encart 17.1), et constituent le **plasma germinatif**. Après la fécondation, celui-ci est redistribué au niveau du pôle végétatif par l'intermédiaire des microtubules. Lors de la segmentation, il est d'abord réparti entre les quatre premiers blastomères, puis se retrouve localisé dans un nombre restreint de cellules bordant le plancher du blastocèle. Il se présente alors dans ces cellules sous l'aspect d'une masse basophile englobant des mitochondries et coiffant le noyau. Lorsque s'amorcent les mouvements de la gastrulation, ce plasma germinatif est localisé dans quelques centaines de cellules où les divisions et synthèses d'ARN sont alors inhibées. Un nombre limité d'entre elles, après leur migration, sera inclus dans les crêtes génitales.



ENCART 17.1

Déterminants cytoplasmiques et lignée germinale chez les Invertébrés

Chez les Invertébrés, l'existence de déterminants cytoplasmiques a été également démontrée. Localisés dans une région précise au sein de l'œuf vierge (exemple du plasma polaire situé dans la région postérieure de l'ovocyte chez la drosophile) ou subissant une redistribution cytoplasmique suite à la fécondation (cas des granules P chez *C. elegans*), ces déterminants seront ségrégués lors de la segmentation et conféreront aux cellules qui les contiennent une destinée germinale.

Chez la drosophile, une cellularisation précoce se produit dans la région périplasmique postérieure de l'embryon et une trentaine de cellules contenant des granules polaires cytoplasmiques s'individualisent. Une absence de formation des cellules polaires est constatée si on pratique sur l'œuf une irradiation par des UV de la région cytoplasmique postérieure et l'individu adulte sera stérile (Geigy, 1931). La fertilité est restaurée si on injecte dans l'œuf irradié, du plasma polaire provenant d'un œuf intact (Okada et coll., 1974). L'identification des déterminants responsables de la formation et de la spécification des cellules polaires qui constitueront les gonocytes primordiaux, n'est pas encore achevée, mais la caractérisation de certains transcrits ou produits présents spécifiquement dans le plasma polaire a déjà été réalisée (ARN-m des gènes *germ cell-less* et *vasa* ou produit du gène *Oskar* auquel se trouve lié le transcrit *Nanos*, par exemple). Ces divers constituants polaires sont responsables soit de l'inhibition de l'expression de gènes somatiques soit de la formation et différenciation des cellules germinales.

Le plasme germinatif est riche en ARN-m et contrôle le devenir des cellules où il se trouve. Chez le xénope par exemple, un ARN-m spécifique y a été caractérisé, l'ARN-m *Xcat2*. La destruction de ces déterminants par rayonnements ultraviolets provoque une stérilité totale des gonades ; celle-ci peut être évitée par une injection d'un autre plasme germinatif dans l'hémisphère végétatif de l'œuf irradié.

Chez les Oiseaux, Reptiles et Mammifères, on n'a pas pu mettre en évidence aussi précocement un plasme germinatif.

Chez les Mammifères, la capacité des cellules embryonnaires à fournir des cellules germinales primordiales se restreint progressivement. Au stade du blastocyste, les cellules du trophoctoderme perdent cette capacité tandis que les cellules épiblastiques du bouton embryonnaire la conservent. Issues de l'épiblaste, certaines cellules entreprennent une migration vers les ébauches gonadiques et conservent leurs potentialités de cellules germinales primordiales. Elles sont au départ peu nombreuses, une centaine chez la souris, qu'on dénombre dans le mésoderme extra-embryonnaire postérieur ; elles prolifèrent activement pendant leur migration.

b) Caractéristiques

Les cellules germinales primordiales ont été étudiées dans de nombreux groupes. Elles sont généralement caractérisées par leur grande taille comparativement aux cellules voisines, un noyau volumineux arrondi avec de gros nucléoles, du glyco-gène abondant et de nombreuses gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme, ces derniers constituants servant sans doute de réserves énergétiques nécessaires à la migration. De plus, une activité phosphatasique alcaline positive ainsi que la teneur élevée de certains transcrits tels ceux de *Oct3/4* permettent de les distinguer des cellules environnantes. Pendant la phase de migration, elles sont de forme irrégulière avec des pseudopodes suggérant qu'elles se déplacent par des mouvements amiboïdes. Parvenues dans les crêtes génitales, elles sont arrondies et immobiles.

17.1.3 Migration des cellules germinales et colonisation des crêtes génitales

a) Chez les Amphibiens Anoures (fig. 17.1)

Pendant la gastrulation, puis la neurulation, les cellules germinales sont d'abord localisées dans l'endoderme ventral¹. Elles migrent ensuite vers l'endoderme dorsal (toit du tube digestif). Se déplaçant par des mouvements amiboïdes dans les espaces extra-cellulaires, elles sont guidées par des mécanismes de reconnaissance de certains constituants matriciels telle la fibronectine (c'est le cas du xénope). Elles gagnent la paroi de la cavité péritonéale par l'intermédiaire du mésentère dorsal puis se regroupent en un amas unique, formant une bandelette médiane à la racine de ce dernier. Cet amas se dédouble et les cellules migrent dans les crêtes génitales, colonisant leurs épithéliums qui deviennent les **épithéliums germinatifs**.

1. Chez les Amphibiens Urodèles, les cellules germinales proviennent du mésoderme des lames latérales.

b) Chez les Oiseaux

Les cellules germinales primordiales dérivent de cellules épiblastiques ayant migré dans une zone en croissance formée par de l'hypoblaste, située dans la région antérieure de l'aire pellucide. Cette extrémité céphalique du disque embryonnaire forme, au moment de la gastrulation, le **croissant germinale** antérieur dans lequel les gonocytes primordiaux prolifèrent (voir § 9.3.3). Lorsque les premiers vaisseaux sanguins se différencient dans cette zone, les cellules germinales y pénètrent par diapédèse¹. Elles sont alors véhiculées par la circulation sanguine jusque dans la région de l'intestin postérieur. À ce niveau, elles sortent des vaisseaux selon un mécanisme qui reste à découvrir et rejoignent par l'intermédiaire du mésentère dorsal, les crêtes génitales qu'elles colonisent de façon asymétrique (le nombre de gonocytes est 2 à 5 fois plus élevé dans la crête gauche que dans la droite), et vers lesquelles elles sont guidées par **chimiotaxie**.



L'existence de cette chimiotaxie a été mise en évidence par Dubois et Cumminge (1974), en cultivant un épithélium embryonnaire de crête génitale encore stérile en contact avec une gonade indifférenciée de 5 à 6 jours. Les gonocytes indifférenciés quittent la gonade et sont attirés vers l'épithélium de la crête génitale. Une substance responsable de cette attraction pourrait être le Sdf1 (pour « Stromal-derived factor-1 ») chez le poulet (Stebler et coll., 2004). Par ailleurs, si de la concanavaleine A (voir note du § 4.2.2a) est ajoutée dans le milieu de co-culture, l'aptitude à migrer des gonocytes est altérée et ceux-ci sont désorientés. De même, dans des blastoderms d'embryons ayant 20 paires de somites, cultivés pendant 10 heures en présence de concanavaleine A à 250 µg/ml, le nombre moyen de gonocytes primordiaux colonisant leurs ébauches gonadiques est 5 fois plus faible que celui observé chez les témoins cultivés sans concanavaleine. Le fait qu'en présence d'une lectine, les gonocytes perdent leur pouvoir migratoire, montre le rôle déterminant des glycoprotéines membranaires dans le mécanisme qui conduit à la mise en place des cellules germinales chez l'embryon de poulet.

c) Chez les Mammifères

Les cellules germinales ont été identifiées à l'aide d'anticorps fluorescents spécifiquement dirigés contre certains constituants membranaires. Chez l'embryon de souris de 6 jours et demi, quelques cellules sont détectées pour la première fois au niveau de l'épiblaste, près de sa jonction avec l'ectoderme extra-embryonnaire. Lors de la gastrulation, à partir de la région postérieure de la ligne primitive, ces gonocytes primordiaux pénètrent dans l'endoderme situé près du pédicule allantoïdien et du sac vitellin et y résident jusqu'au 9^e jour. De là, elles gagnent le mésentère dorsal et, parvenues au niveau des crêtes génitales, elles les colonisent entre le 11^e et 12^e jour de gestation, après s'être divisées en deux lots. Les cellules germinales primordiales prolifèrent pendant leur migration : de l'ordre de quelques dizaines à 7-8 jours de gestation, elles sont plusieurs milliers (2 500 à 5 000) 3 à 4 jours plus tard en atteignant les crêtes génitales Cette prolifération serait sous la dépendance du Fgf7 et du

1. Diapédèse : Traversée de la paroi des capillaires sanguins par des cellules à l'aide de mouvements amiboïdes (cas des lymphocytes et des macrophages par exemple).

SCF (pour « Stem Cell Factor »). Des résultats récents obtenus *in vitro* montrent que les crêtes génitales d'embryons de souris sécrètent différents facteurs dont le Sdf1 qui, comme chez le poulet, pourrait jouer un rôle dans l'attraction des gonocytes. De plus, au terme de leur migration, les gonocytes, en se liant aux cellules somatiques des crêtes génitales, empêchent leur propre entrée en apoptose. Chez l'homme, les gonocytes primordiaux achèvent leur migration et pénètrent dans les crêtes génitales au début de la sixième semaine de gestation.

d) Chez la drosophile

Les cellules polaires restent, dans un premier temps, intimement associées au territoire de l'intestin moyen postérieur qui s'invagine dorsalement lors des phases précoces de la gastrulation et subissent ainsi une intériorisation passive en tapissant extérieurement le fond aveugle de la poche intestinale en formation (voir § 7.2). Ces cellules traversent ensuite la paroi intestinale, rejoignent le mésoderme viscéral et s'alignent en deux lots distincts de chaque côté de la région dorsale de l'ébauche de l'intestin moyen postérieur. Ce processus est sous la dépendance de facteurs endodermiques tel que le produit du gène *wunen*. Les cellules gagnent ensuite les ébauches gonadiques différenciées à partir du mésoderme latéral postérieur. Le produit du gène *columbus* émis par ces ébauches et Hedgehog sont impliqués dans l'attraction des gonocytes vers les gonades. La différenciation des gonocytes primordiaux ainsi que celle des gonades ne se mettent en place qu'à partir de la métamorphose.

17.1.4 Formation de gonades indifférenciées

Chez tous les Vertébrés, quel que soit le sexe génétique de l'individu, les ébauches de gonades présentent, à un stade précoce de leur développement, un même type d'organisation ne permettant pas de préjuger du sens de leur différenciation phénotypique future. Ceci correspond au stade des **gonades indifférenciées**.

Selon une conception classique élaborée à partir des années 1930 par Witschi (fig. 17.1 et 17.2), les gonades présenteraient à ce stade deux régions distinctes, le **cortex** et la **médulla**. Suivant ce schéma, par suite d'une prolifération active des cellules somatiques de la crête génitale, l'épithélium germinatif, en s'épaississant, est à l'origine de la région corticale. À partir de cette dernière se constituent des **cordons sexuels primaires** aux formes irrégulières contenant la plupart des gonocytes qui se sont également multipliés. Ces cordons rattachés à l'épithélium péritonéal épaissi s'insinuent dans le mésenchyme qui occupe la cavité de la crête génitale. Issu du blastème mésonéphrétique sus-jacent, ce tissu mésenchymateux constitue la **médulla** gonadique.

En fait, cette double origine gonadique présente des variantes suivant les espèces : l'épithélium coelomique seul interviendrait chez les Poissons Téléostéens et certains Amphibiens Anoures, alors que participeraient le mésonéphros et l'épithélium coelomique chez les Mammifères et les Oiseaux. Cependant, chez quelques Mammifères, dont l'homme (Satoh, 1991), la gonade pourrait se former à partir du mésonéphros seul (fig. 17.3).

L'expression des gènes autosomiques *LHx9*, *Sf1* et *Wt1* est nécessaire à la formation des ébauches de gonades. Ils s'expriment précocement dans les crêtes génitales, avant la mise en place des gonades sous une forme indifférenciée. Lorsqu'ils ne s'expriment pas, il ne se forme pas de gonades. L'expression de certains de ces gènes jouera ultérieurement un rôle primordial dans la différenciation en testicule ou ovaire, déterminée selon le sexe chromosomique de l'individu (voir tableau 17.1 et fig. 17.7).



LHx9 (pour « *LIM homeobox 9 gene* ») code pour un facteur de transcription qui régule des gènes impliqués dans la prolifération des cellules somatiques des crêtes génitales. L'extinction de *Lhx9* chez la souris conduit à une absence de développement des gonades et à une diminution du facteur Sf1, indiquant que l'expression de ce facteur est sous la dépendance de ce gène.

- *Wt1* (pour « *Wilm's Tumor gene 1* ») a pour produit un facteur de transcription à doigts de zinc qui régule l'expression de plusieurs gènes actifs dans le développement du rein. Chez les embryons de souris atteints d'une double mutation provoquée de *Wt1*, il ne se forme ni rein, ni gonade de l'un ou l'autre sexe. L'expression de *Wt1*, observée précocement dans les pièces intermédiaires, puis dans les crêtes génitales chez l'embryon de souris de 9 jours, se poursuit durant toute la vie au niveau des gonades.
- *Sf1* (pour *Steroidogenic factor 1*) est un gène autosomique dont l'expression est nécessaire dès la formation des crêtes génitales. La délétion de *Sf1* chez la souris entraîne l'absence des glandes surrénales et des gonades, par dégénérescence précoce de celles-ci. Il jouera un rôle actif dans la différenciation testiculaire.

D'autres gènes, *DAX1* et *WNT4*, s'expriment également dans les crêtes génitales indifférenciées, puis sont ultérieurement réprimés dans les ébauches gonadiques testiculaires (voir § 17.3. 5b).

17.1.5 Différenciation des gonades (fig. 17.2, 17.3, 17.4)

La différenciation des gonades dépend de l'expression de certains gènes dont l'activation est directement associée au sexe génotypique de l'individu. Cette détermination génique sera abordée plus loin (voir § 17.3).

a) Évolution en testicule

Selon les espèces, le blastème gonadique peut soit être formé uniquement à partir du blastème mésonéphrétique ou de l'épithélium péritonéal soit avoir une origine mixte.

Dans certains cas, suivant le modèle de différenciation classique, de volumineux cordons sexuels ou **cordons testiculaires**, formés à partir de l'épithélium germinatif et comportant à la fois des cellules germinales et des cellules somatiques, envahissent la zone centrale gonadique puis se séparent de l'épithélium. Ce dernier ne possède plus alors de gonocytes (fig. 17.2B, C).

Chez certaines espèces tel l'homme ou le rat, une origine exclusivement mésonéphrétique est proposée pour le blastème gonadique (Sato, 1991). Dans ce cas, des ensembles cellulaires issus du mésonéphros s'organisent en cordons (à la 6^e semaine de gestation chez l'homme), et sont colonisés par les gonocytes ayant

17 • Différenciation des gonades et différenciation sexuelle

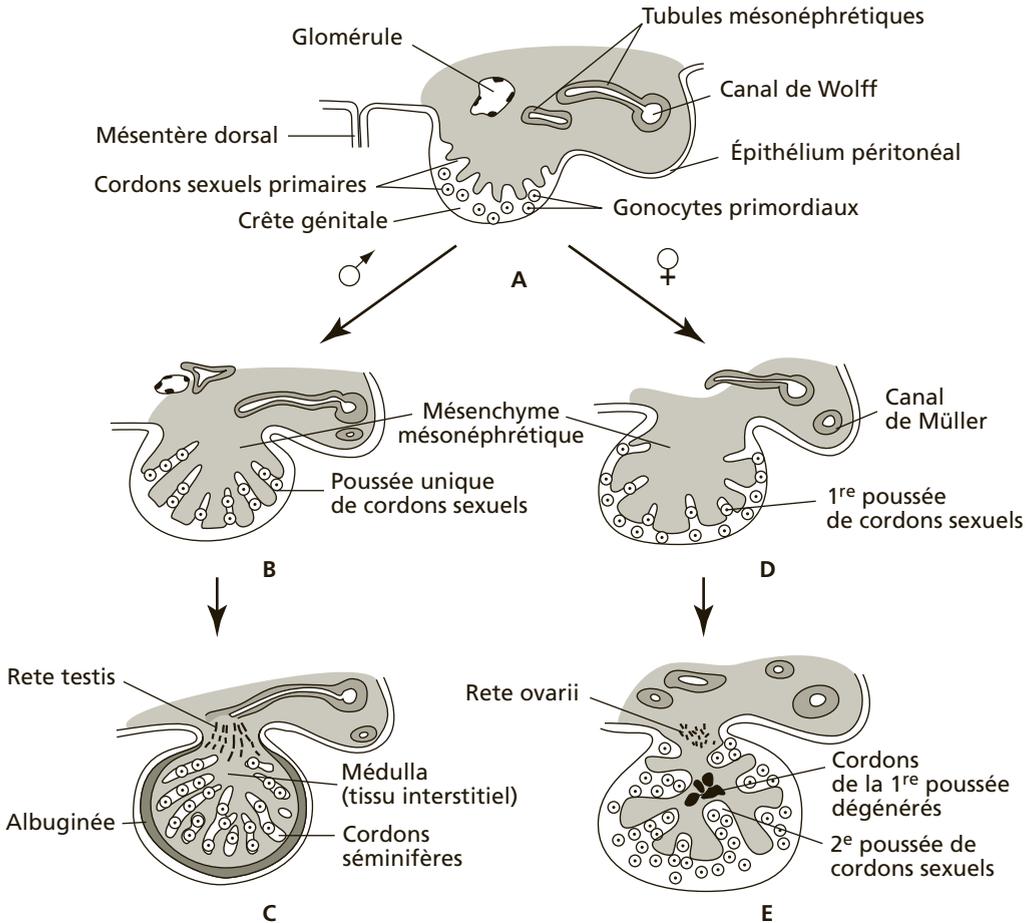


Figure 17.2 - Différenciation des gonades chez un Mammifère.

A : *Gonade indifférenciée.* La structure mésenchymateuse d'origine mésonéphrétique est représentée en gris. **B et C :** *Évolution testiculaire.* **B :** On observe une seule poussée de cordons sexuels. **C :** Les cordons s'isolent au sein de la médulla qui devient le tissu interstitiel et forme les cordons séminifères. Une connexion subsiste entre les tubules mésonéphrétiques et les cordons séminifères qui sont détachés de l'épithélium péritonéal. **D et E :** *Évolution ovarienne.* **D :** Une première poussée de cordons sexuels a lieu, des gonocytes subsistant dans l'épaisseur de l'épithélium péritonéal. **E :** Une seconde poussée de cordons entraîne des gonocytes et reste en liaison avec l'épithélium péritonéal. Les premiers cordons sexuels dégénèrent. Aucune connexion ne subsiste entre les tubules mésonéphrétiques et les constituants gonadiques (d'après Witschi).

transité préalablement par l'épithélium péritonéal gonadique. Là encore, ce dernier redevient stérile, ce qui correspond à l'une des caractéristiques de l'évolution testiculaire (fig. 17.3B, C).

Quel que soit leur mode de formation, les cordons testiculaires possèdent des cellules somatiques, les **cellules de Sertoli** dont la différenciation serait sous la dépen-

Partie 3 • Mécanismes de la morphogenèse

dance d'un facteur produit par les cellules germinales. Elles possèdent un cytoplasme clair et abondant et un réticulum endoplasmique vésiculeux. Jouant un rôle de soutien, celles-ci s'organisent en épithélium à la périphérie des cordons sexuels, formant ainsi une surface continue et régulière délimitée extérieurement par une lame basale. Enserées parmi les cellules de Sertoli, les cellules germinales sont devenues les **spermatogonies primordiales**. Elles sont arrondies, avec un cytoplasme dense, et présentent un noyau contenant un ou plusieurs nucléoles.

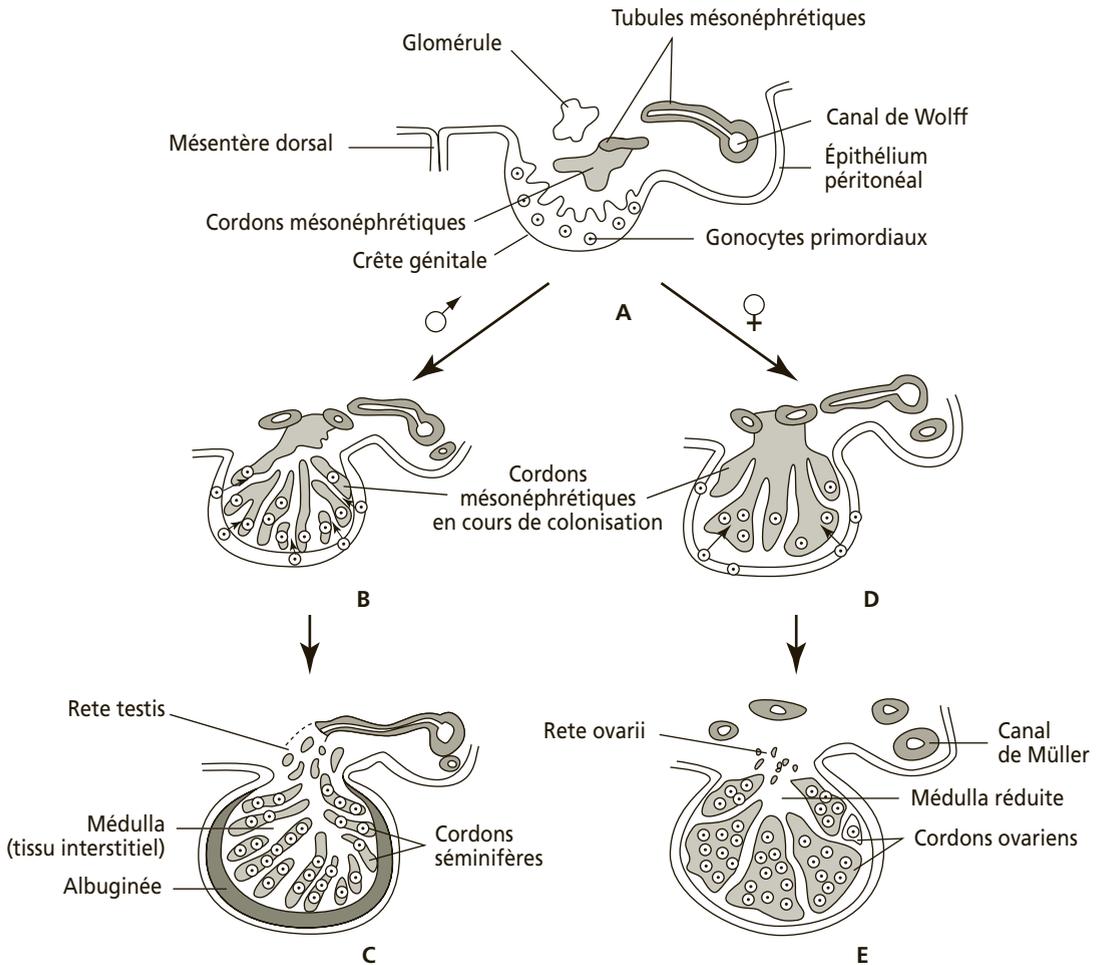


Figure 17.3 - Différenciation des gonades chez l'homme.

A : *Gonade indifférenciée.* À partir du blastème mésonéphrétique sont émis des cordons qui vont envahir la cavité de l'ébauche gonadique. **B et C :** *Évolution testiculaire.* **B :** Les gonocytes colonisent les cordons mésonéphrétiques. **C :** Ces derniers se transforment progressivement en cordons séminifères qui resteront en relation avec les tubules mésonéphrétiques par l'intermédiaire du rete testis. **D et E :** *Évolution ovarienne.* **D :** Des cordons mésonéphrétiques volumineux élargis à leur extrémité sont colonisés par les gonocytes. **E :** Les cordons mésonéphrétiques qui se sont formés les derniers constituent le rete ovarii qui n'assure pas de connexion avec le réseau tubulaire du mésonéphros (d'après Satoh).

Chez les Mammifères, les cordons testiculaires ne se creuseront en tubes séminifères qu'à la puberté. Jusqu'à cette période, il n'y aura pas de multiplication active des spermatogonies et leur entrée dans le processus de la spermatogenèse est inhibée par des facteurs sécrétés par les cellules somatiques des cordons testiculaires. De plus, la barrière hémato-testiculaire n'étant pas formée (voir § 2.1.3a), les sécrétions des cellules de Sertoli peuvent diffuser librement dans les tissus voisins.

Entre les cordons testiculaires, le mésenchyme médullaire se développe pour former le **tissu interstitiel**. Les **cellules de Leydig** sécrétrices de testostérone s'y différencient. Au niveau du hile de la future gonade, des cordons mésonéphrétiques anastomosés assurent la liaison entre les cordons testiculaires et des tubules du mésonéphros. Ce réseau est à l'origine du **rete testis**. À la périphérie du testicule, le conjonctif médullaire devient dense et fibreux et forme l'**albuginée**. Cette tunique est doublée par l'épithélium coelomique de la crête génitale qui, vidé des cellules germinales, est devenu mince et stérile (fig. 17.4A).

Les testicules dits **tubulaires**, c'est-à-dire comportant des tubules séminifères, ne sont observés que chez les Vertébrés supérieurs (ou Amniotes). Chez les Vertébrés Anamniotes, les testicules comportent des compartiments germinaux désignés sous le terme de **cystes**. Ceux-ci sont des sortes de sacs, regroupés ou non dans des lobules, qui contiennent des cellules germinales issues d'une même cellule souche et évoluant de manière synchrone. Ce dernier type d'organisation testiculaire est également observé chez les Insectes.

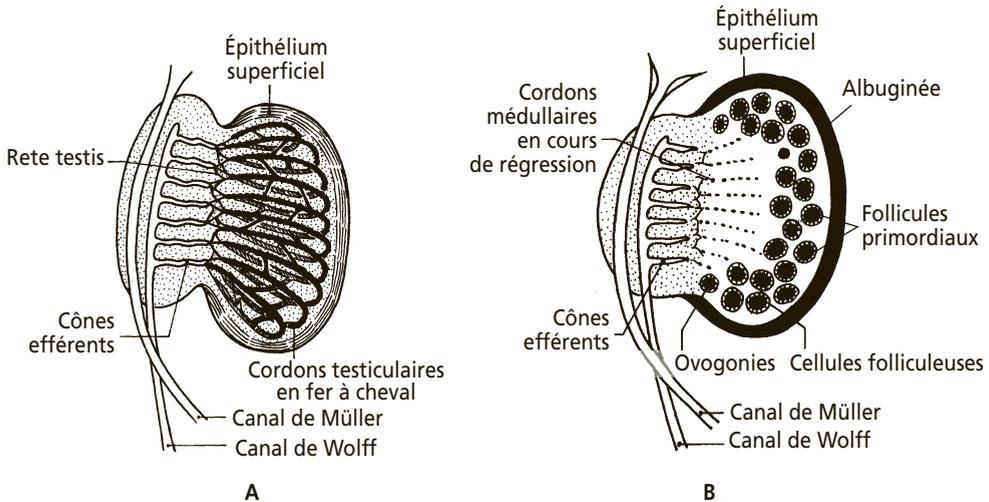


Figure 17.4 - Représentation schématique du testicule et de l'ovaire chez l'embryon humain.

A : Testicule d'un embryon âgé de 4 mois. Les cordons testiculaires forment des boucles et sont reliés, par l'intermédiaire du *rete testis*, aux conduits mésonéphrétiques transformés en cônes efférents. **B** : Ovaire d'un embryon âgé de 5 mois. Les cordons médullaires disparaissent progressivement cependant que s'accroît la région corticale où se forment les premiers follicules primordiaux associant ovogonies et cellules folliculeuses. Les conduits mésonéphrétiques régressent et n'assurent plus de connexion (d'après Langman et Sadler, 1996).

b) Évolution en ovaire

• *Chez les Amphibiens et les Sauropsidés*

Les gonades indifférenciées évoluent en **ovaires de type creux**. Les gonocytes se multiplient dans le cortex et donnent les ovogonies primaires qui forment des nids de cellules. Les ovogonies issues d'un même gonocyte restent reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques et subissent une maturation synchrone en devenant toutes en même temps des ovocytes en pré-méiose. Des cellules folliculeuses issues de l'épithélium péritonéal entourent les ovocytes (voir fig. 3.4). Chez les Amphibiens, au hile de la glande, persistent quelques ovogonies qui, en se multipliant, seront à l'origine d'un nouveau lot d'ovocytes après chaque période de ponte.

Le mésenchyme médullaire qui est resté stérile, involue quand commence la multiplication des gonies. Il se forme ainsi une ou plusieurs cavités ovariennes qui se combleront partiellement par suite du gonflement du cortex dans lequel prolifèrent les ovogonies.

• *Chez les Mammifères*

La différenciation des ovaires est classiquement présentée comme résultant de **deux poussées successives de cordons sexuels** à partir de la région corticale de la gonade indifférenciée (fig. 17.2 D, E). Les cordons issus de la première poussée contiennent des cellules somatiques et quelques cellules germinales primordiales, ces dernières restant en majorité localisées dans le cortex. Cette première génération de cordons dégénère. Une seconde poussée se produit, les cordons renfermant alors l'ensemble des cellules germinales restantes qui deviennent des ovogonies. Dans cette conception, à la différence de l'évolution testiculaire, les cordons sexuels restent associés à la structure corticale. Cette dernière caractéristique illustre la divergence, considérée comme classique, entre les évolutions mâle ou femelle de la gonade indifférenciée : prédominance corticale dans l'évolution ovarienne et médullaire dans la différenciation testiculaire.

• *Chez la femme*

L'ovaire pourrait se différencier à partir du blastème mésonéphrétique seulement. Il existerait en fait diverses modalités de différenciation ovarienne en fonction de la manière dont s'est formée la gonade indifférenciée. Ainsi, selon des observations rapportées par Satoh (1991), la mise en place des structures ovariennes chez la femme s'effectue à partir d'un processus semblable à celui décrit chez l'homme pour la différenciation testiculaire (fig. 17.3 D, E). Des cordons d'origine mésonéphrétique constituant le blastème gonadique se forment entre la 7^e et 11^e semaine de gestation. Ils sont colonisés par les gonocytes issus de l'épithélium péritonéal. Ils acquièrent une morphologie irrégulière par suite de l'épaississement de leurs extrémités jouxtant l'épithélium cœlomique, dû à une prolifération des cellules germinales

Quelles que soient les espèces considérées, à la différence de l'évolution testiculaire, aucune connexion ne persiste au niveau du hile entre les cordons sexuels et les tubes mésonéphrétiques. Seules subsistent des structures résiduelles constituant le **rete ovarii**.

Les ovogonies se divisent par mitoses et restent reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques. Lorsqu'elles cessent de se diviser et entrent en prophase de la division I de méiose, elles s'isolent et sont entourées par quelques cellules somatiques dont

l'origine reste discutée (cellules de l'épithélium cortical chez la femme, du blastème mésonéphrétique médullaire chez la souris) et qui sont à l'origine des cellules folliculeuses. Ces ensembles constituent les **follicules primordiaux**, comprenant le jeune ovocyte primaire et les cellules folliculeuses (fig. 17.4 B et fig. 3.3).

Chez les Mammifères, à l'exception des Monotrèmes, la partie centrale médullaire de l'ébauche ovarienne ne régresse pas. Les cellules somatiques mésenchymateuses qui entourent les follicules sont à l'origine des thèques (voir § 3.1.3b). Les **ovaires** ainsi formés sont de **type plein** (fig. 3.2).

17.2 DIFFÉRENCIATION DES CONDUITS GÉNITAUX (fig 17.5)

Les produits génitaux mâles chez les Poissons cartilagineux, les Amphibiens et les Amniotes, sont évacués par l'intermédiaire de conduits qui ont une origine commune avec les conduits urinaires. Il convient de décrire sommairement l'évolution de l'appareil excréteur pour comprendre l'origine des conduits génitaux.

17.2.1 Différenciation des conduits urinaires

Les reins se différencient à partir du mésenchyme néphrétique issu des pièces intermédiaires. Des gènes des familles Pax et Lim (voir § 11.1.1a) contrôlent la formation successive des **pronéphros**, **mésonephros** et **métanéphros** (Bouchard et coll., 2000-2003). L'inactivation des gènes *Pax2* et *Pax8* ainsi que *Lim1* empêche l'établissement de toute structure néphrétique, l'épithélium des tubes néphrétiques ne pouvant pas se former à partir du mésenchyme mésodermique. L'expression de *Pax2* est plus précisément nécessaire à la formation du mésonéphros.

Le **pronéphros** est le premier rein formé et le plus antérieur. Il n'est fonctionnel que chez l'embryon de quelques Vertébrés inférieurs. Les trois premiers tubules confluent et forment un bourgeon qui croît vers le cloaque et se différencie en **uretère primaire**. Une seconde série de tubules se développe plus tard à un niveau plus postérieur du mésenchyme mésodermique, zone formant le blastème mésonéphrétique. C'est le **mésonephros** qui se résorbe chez les Reptiles, les Oiseaux et les Mammifères, mais qui constitue le rein définitif chez les Poissons et les Amphibiens. Les tubules excréteurs mésonéphrétiques sont en relation avec l'uretère primaire qui devient le **canal de Wolff**. Chez les Amniotes, le rein définitif ou **métanéphros** apparaît plus postérieurement, ses tubules excréteurs sont reliés à l'uretère secondaire qui provient du bourgeonnement de la partie postérieure du canal de Wolff. Chez toutes les espèces, le **canal de Müller** se différencie à partir de l'épithélium cœlomique qui s'invagine au niveau du pronéphros. Le bourgeon formé croît parallèlement au canal de Wolff. Dans un premier stade ces structures sont identiques dans les deux sexes et constituent un tractus génital indifférencié dont l'évolution se poursuit ensuite différemment dans le sexe femelle et le sexe mâle.

17.2.2 Différenciation des conduits génitaux femelles

Chez les Mammifères, l'ovaire établit dans un premier temps, par l'intermédiaire des cordons sexuels, des relations avec le canal de Wolff au niveau des tubules

mésonephrétiques. Ces liaisons disparaissent car les cordons sexuels, le canal de Wolff et le mésonephros régressent ; il ne s'établit aucune liaison fonctionnelle avec les tubules mésonephrétiques (fig. 17.4B). Chez les Amphibiens, le canal de Wolff et le mésonephros subsistent chez la femelle mais avec un rôle uniquement dévolu à l'excrétion urinaire.

Les canaux de Müller se transforment en **oviductes** et donnent l'**utérus** après fusion de leur partie terminale. Ils s'ouvrent dans la cavité générale, près de la paroi de l'ovaire, par un pavillon cilié ou **ostium**, dérivé d'un des premiers pavillons ciliés d'un tubule du pronéphros (fig. 17.5).

L'utérus s'ouvre dans le vagin qui est une invagination ectodermique.

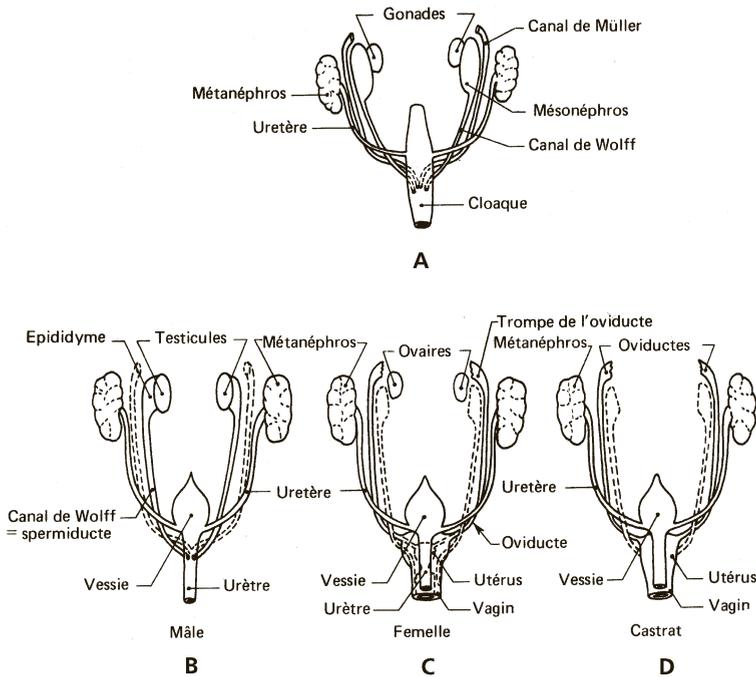


Figure 17.5 - Différenciation des conduits uro-génitaux et des gonades chez un Mammifère.

A : Forme embryonnaire initiale indifférenciée. **B** : Évolution mâle avec régression du canal de Müller. **C** : Evolution femelle avec régression du canal de Wolff. **D** : Chez le fœtus de l'un ou l'autre sexe, castré de façon précoce, les voies génitales sont analogues à celles de la femelle (les conduits en dégénérescence sont représentés par des pointillés).

17.2.3 Différenciation des conduits génitaux mâles

Les cordons testiculaires se prolongent par des **tubes droits** dépourvus de cellules germinales. Ces tubes sont en relation avec un réseau canaliculaire anastomosé, ou **rete testis**, qui assure la liaison avec les tubules excréteurs du mésonephros constituant les cônes ou **canaux efférents** (fig. 17.4A et 2.1).

Chez les Anamniotes, chez lesquels le mésonéphros subsiste et constitue le rein fonctionnel de l'adulte, les produits urinaires et génitaux sont évacués par les mêmes voies et les canaux de Wolff correspondent à des **urospermiductes**.

Chez les Amniotes, le mésonéphros régresse ; c'est le métanéphros, desservi par l'uretère secondaire qui devient fonctionnel. Dans ce cas, les vestiges du mésonéphros fœtal avec lequel le testicule était en communication sont représentés par les canaux efférents et l'épididyme qui se différencie à l'extrémité du canal de Wolff. Ce dernier différencie les vésicules séminales à son extrémité distale. Les deux canaux de Wolff constituent les **canaux déférents** qui aboutissent à la base de la vessie, à l'entrée de l'urètre. Le canal de Müller régresse (fig. 17.5).

(La différenciation des organes génitaux externes ne sera pas examinée ici.)

17.3 RELATIONS ENTRE SEXE GÉNÉTIQUE ET DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

17.3.1 Détermination génétique du sexe (tableau 17.1)

Chez les espèces gonochoriques, c'est-à-dire où les sexes sont séparés, la détermination du sexe mâle ou femelle est sous contrôle génétique et les chromosomes sexuels sont généralement identifiables par examen caryologique. On distingue dans un équipement chromosomique, les **autosomes**, chromosomes morphologiquement semblables dans les deux sexes, et les **hétérochromosomes**, paire de chromosomes présentant un dimorphisme dans un des sexes, et porteurs de gènes déterminant le sexe. Un des sexes est **homogamétique**. Il est homozygote quant aux gènes déterminant le sexe. C'est la femelle chez les Mammifères (porteuse de deux chromosomes X) ; c'est le mâle chez les Oiseaux et certains Poissons. Chez les Amphibiens, c'est le mâle pour certaines espèces (pleurodèle), la femelle pour d'autres (grenouille). L'autre sexe est **hétérogamétique**. Il possède un chromosome X et un chromosome Y. C'est le mâle chez les Mammifères, la femelle chez les Oiseaux. Lorsque c'est la femelle qui est hétérogamétique, on emploie les sigles ZZ pour la formule du mâle et ZW pour la femelle.

À la méiose, le sexe hétérogamétique forme deux types de gamètes : chez les Mammifères, les spermatozoïdes sont porteurs du chromosome X ou du chromosome Y, les ovules sont tous identiques porteurs de X uniquement. Après la fécondation, les embryons femelles XX possèdent un double lot de gènes allèles portés par X tandis que les embryons mâles ne possèdent qu'un seul lot. La quantité de gènes actifs portés par X est cependant la même chez le mâle et la femelle, car l'équilibre se trouve rétabli par l'inactivation au hasard d'un chromosome X dans les cellules de la femelle en cours de développement. Il formera une masse d'hétérochromatine appelée **corpuscule de Barr** chez les Mammifères (voir *infra* § 17.4.6).

Chez les Insectes, (exemple la drosophile), malgré la présence d'hétérochromosomes X et Y, c'est le rapport du nombre de X sur le nombre d'autosomes qui conditionnera le sexe phénotypique de l'individu. Un rapport de 1 est observé chez les femelles normales dont la formule chromosomique est 2A XX (A pour autosome). Un mâle normal a pour formule

2A XY, mais des individus dépourvus de Y, de formule 2A X0, sont également mâles mais stériles. Ainsi le sexe chez ces espèces dépend d'un équilibre entre déterminants femelles portés par les chromosomes X et déterminants mâles présents sur les autosomes. Y est dépourvu de ces derniers déterminants, mais possède en revanche des gènes nécessaires à la formation des spermatozoïdes. L'absence d'hormones sexuelles chez les Insectes conduit à ce que chaque cellule développe sa propre détermination sexuelle. Si durant les stades précoces du développement se produit une perte accidentelle d'un chromosome X dans une cellule, ses descendantes auront une formule X0 et une différenciation phénotypique de type mâle. L'adulte sera un individu mosaïque à territoires mâles et femelles. Ce phénomène est désigné sous le terme de **gynandromorphisme**.

17.3.2 Formule chromosomique et différenciation des gonades

Le lien entre sexe génétique et sexe morphologique ne répond pas à une règle unique dans le règne animal.

D'autres facteurs peuvent intervenir dans de nombreuses espèces. En ne considérant que les Vertébrés, on peut noter, par exemple, que chez certains poissons (g. *Anthias* ou g. *Amphiprion*), la proportion de mâles et de femelles dans une population peut influencer la différenciation sexuelle des jeunes qui ont cependant un sexe génétique.

Chez certains Reptiles, comme les tortues, ou les crocodiles, la différenciation sexuelle dépend de la température à laquelle les œufs ont été incubés dans la nature, indépendamment du sexe génétique pour lequel la proportion reste 50/50 (voir encart 17.2). Une température critique, propre à chaque espèce a été mise en évidence lors de l'incubation, elle déterminera l'éclosion de jeunes en majorité ou en totalité du même sexe. Chez la tortue des marais (*Emys orbicularis*), par exemple, à une température supérieure à 30°C, il n'écloît que des femelles, et à moins de 22°C, que des mâles. Incubés à 28°C, la sex-ratio 50/50 est respectée (Pieau et coll., 1994).

Chez les Oiseaux, comme chez les Mammifères, en l'absence de gonades embryonnaires faisant suite à une castration expérimentale par exemple, la morphologie de l'individu sera celle du sexe homogamétique : Mammifères d'aspect femelle, Oiseaux d'aspect mâle. Des observations similaires ont été faites chez les Amphibiens.

Nous n'envisageons ici que le cas des Vertébrés supérieurs et plus particulièrement celui des Mammifères.

Comme on l'a vu, le phénotype sexuel évolue vers la morphologie femelle en l'absence de chromosome Y. C'est le cas de la femelle XX, mais aussi d'individus porteurs de X0 (**syndrome de Turner**) ou XXX. La présence d'un chromosome Y induit une morphogénèse de type mâle, et ceci quel que soit le nombre de X : XY (cas normal), XXY, (**syndrome de Klinefelter**), XXXY. Les gènes actifs de la masculinisation se trouvent donc portés par le chromosome Y.

17.3.3 Localisation du gène de masculinisation chez les Mammifères

Les gènes de masculinisation ont été localisés sur le chromosome Y des Mammifères dès 1959. La cytogénétique et les techniques de biologie moléculaire appliquées



Relations entre température, activité hormonale et phénotype sexuel chez les Reptiles

Une enzyme, l'aromatase (voir fig.3-6) convertit la testostérone en œstradiol. Elle jouerait un rôle critique ; en effet, chez la tortue, on obtient expérimentalement des mâles, lorsque l'enzyme est inhibée. Parallèlement, dans la nature, l'activité de l'enzyme est faible chez cette espèce à la température de 25 °C qui stimule la différenciation en mâles ; par contre, à 30 °C, température favorable aux femelles, l'activité de l'enzyme est élevée pendant la période de détermination du sexe (Pieau et coll., 1994).

On a par ailleurs montré expérimentalement que, chez les Reptiles, la différenciation sexuelle est, à la différence des Mammifères, influencée par les hormones dans sa première phase, au cours d'une période critique où a lieu la différenciation des gonades. L'apport d'œstrogènes peut alors l'emporter sur la température et induire une différenciation ovarienne chez des mâles génétiques, même à des températures masculinisantes. De même, l'injection d'inhibiteurs d'œstrogènes induit la différenciation en mâles. La différenciation des ébauches de gonades isolées et mises en culture obéit aux conditions de température de la même manière. Il n'y a donc pas dans cette différenciation, d'influence hormonale indirecte, telle par exemple qu'une action de l'hypophyse ou du cerveau (Porter et coll., 2005) .

Une autre explication est aussi proposée, qui n'exclut pas la première. La température serait un facteur accélérant le rythme des mitoses qui se produisent parmi les précurseurs de cellules de Sertoli dans la phase critique de la différenciation mâle. Comme il existe un seuil critique du nombre de cellules de Sertoli pour orienter la différenciation sexuelle vers la voie mâle (Schmahl et coll., 2003), un niveau optimum de température serait déterminant.

à des individus normaux ou porteurs d'anomalies génétiques, chez l'humain et la souris, ont permis de localiser ce gène avec une grande précision.

Il existe, chez l'espèce humaine, des anomalies peu répandues (environ 1 pour 20 000 naissances pour chaque type d'anomalie), où des individus de sexe masculin, normaux ou porteurs de certaines ambiguïtés dans leurs organes sexuels, ont une formule chromosomique 46 XX et des femmes, sans ambiguïté morphologique, mais stériles qui ont une formule 46 XY. Pour un certain nombre d'entre eux (ou elles), des examens médicaux ont été étendus aux membres de leur famille, père, frère et sœur, qui ont donc subi des examens approfondis de leur formule chromosomique. Toutes les anomalies ainsi reconnues chez l'humain ont pu être reproduites, avec une plus grande abondance de matériel et des possibilités d'études génétiques, dans des lignées de souris expérimentales.



La cytogénétique permet de repérer les chromosomes X et Y. Ce dernier, notamment, se colore très spécifiquement à la quinacrine étant donné l'abondance de son hétérochromatine. Des anomalies structurales (délétions, translocations de fragments de Y sur X) peuvent être reconnues, si elles sont suffisamment importantes. Une carte du chromosome Y a été dressée.

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'isoler et de cloner l'ADN du chromosome Y et de l'utiliser pour repérer sa présence par hybridation moléculaire avec les molécules d'ADN dénaturées sur électrophorèse (méthode de Southern blot). Chez un sujet qui n'a pas de chromosome Y individualisé, mais qui est porteur de caractères mâles, une réaction d'hybridation permet de s'assurer qu'un fragment de Y est présent dans le génome, sa position anormale étant le résultat d'une translocation sur X ou sur un autosome. La position de l'ADN hybride sur l'électrophorèse permet d'apprécier la longueur du fragment de Y.

a) Structure du chromosome Y (fig. 17.6)

Cet hétérochromosome, de taille réduite, porte un bras court et un bras long. Chaque extrémité de ces bras présente une région d'homologie avec le chromosome X désignée sous le terme de **région pseudo-autosomale** (PAR). C'est au niveau de la région PAR1 du bras court que des recombinaisons avec X peuvent se produire lors de l'appariement des chromosomes X et Y à la méiose.

- *Un déterminant sexuel a été localisé sur le bras court du chromosome Y (fig. 17.6).* Sur les bras courts, les recombinaisons observées se produisent avec une fréquence qui décroît de 50 % à 0 %, depuis l'extrémité du chromosome jusqu'à la région non recombinante qui suit. C'est là, proche de la région pseudo-autosomale PAR1, qu'a été identifiée en 1986, une région codant pour ce qui était désigné à l'époque, le **TDF** (pour « **Testicular Determining Factor** »), responsable de la différenciation des gonades embryonnaires en testicules. Compte tenu de la localisation de cette région, cela permettait de comprendre que, dans de rares cas, un « crossing-over » inégal entre X et Y puisse transporter cette région sur X et en priver Y. Dans un tel cas, le spermatozoïde qui posséderait cet X portant le facteur de masculinisation pourrait, s'il participe à la fécondation, être à l'origine d'un mâle XX. En revanche, le spermatozoïde porteur du chromosome Y ayant subi cette délétion, contribuerait au développement d'une femelle XY.

Des observations réalisées sur un certain nombre de sujets à 46 chromosomes concordent avec cette hypothèse : des hommes XX sont porteurs du fragment de Y comportant le facteur de masculinisation, dûment identifié par des méthodes de biologie moléculaire, des femmes XY ne portent pas ce fragment. Ces observations ont pu être confirmées par des travaux expérimentaux sur la souris.

- *Identification et caractérisation du déterminant sexuel porté par Y.* Une série de recherches a été réalisée pour localiser de façon précise le gène de masculinisation et identifier son produit.

L'analyse par séquençage de l'ADN a été effectuée dans la région supposée comporter le facteur masculinisant. Par comparaison entre des individus normaux et des porteurs d'une délétion, on a pu déterminer au sein d'une région de 35 Kilobases (Kb), au voisinage de la zone pseudo-autosomale du bras court, une séquence de 2,1 Kb qui s'avère être présente chez tous les individus mâles XY et chez certains individus mâles XX, et qui code pour un polypeptide de 223 acides aminés. Ce gène, découvert par Sinclair et coll. en 1990, est considéré comme étant le déterminant génique sexuel responsable de la masculinisation, et a été désigné chez l'homme

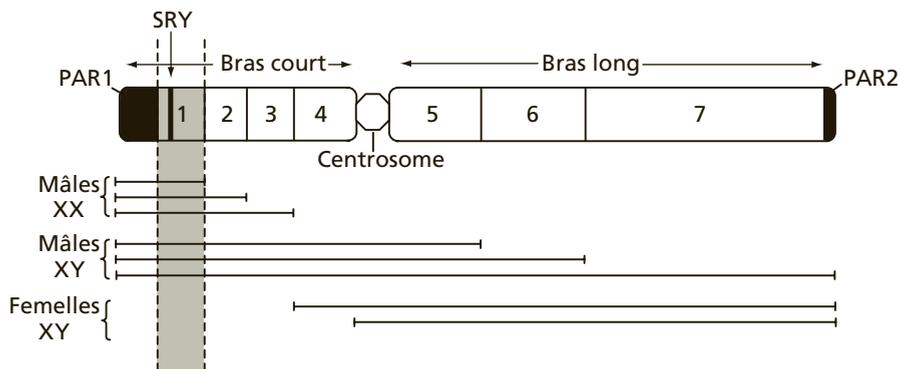


Figure 17.6 - Structure du chromosome Y et schémas représentant les portions de chromosome Y présents dans le génome de mâles XX, de femelles XY et de mâles XY.

Le chromosome Y est divisé en 7 zones (n° 1 à 7) correspondant à des sondes d'ADN radioactif construites pour réaliser des hybridations moléculaires *in situ*, chez des porteurs de formules anormales.

Le chromosome Y est formé d'un bras court et d'un bras long. A l'extrémité de chaque bras, se situe une région pseudo-autosomale (PAR1 et PAR2) (en noir) qui présente des homologies avec une région du chromosome X. La région PAR1 est le site de recombinaisons au cours de la méiose. C'est dans la région non homologue n° 1 (en gris), proche de la région pseudo-autosomale PAR1 que se trouve TDF et qu'est localisé le gène *SRY* de masculinité, et peut être d'autres gènes intervenant dans la différenciation sexuelle mâle.

Les mâles XX sont porteurs d'un fragment du bras court de Y, contenant l'aire du gène de masculinisation, à la suite d'un « crossing-over » inégal lors de la méiose. Les femelles XY ont hérité d'un chromosome paternel Y ayant perdu une part importante du bras long. Des mâles XY peuvent subir une délétion du bras long de Y, sans que leur sexe phénotypique soit modifié (d'après Page, 1985, simplifié).

SRY (pour « **Sex-determining Region of the Y chromosome** »)¹. Son produit *SRY* comporte un domaine de 80 acides aminés qui se lie à l'ADN en provoquant localement une forte courbure de ce dernier. Cette séquence, également présente dans plusieurs facteurs de transcription sous une forme très conservée, est appelée **boîte HMG** (pour « **High-Mobility Group** »). Compte tenu de ses affinités avec l'ADN, il est possible que *SRY* puisse être un facteur de transcription agissant spécifiquement sur divers gènes cibles. Il a été montré qu'il est notamment capable de se lier sur les promoteurs de gènes impliqués dans l'expression de la différenciation mâle (gène de l'hormone anti-mullérienne et gène de la P450 aromatasase intervenant dans la stéroïdogénèse). Par ailleurs, des observations récentes montrant la présence de *SRY* au niveau de splicéosomes, suggèrent une possible implication de ce facteur dans des processus de maturation des pré-ARN-m.

1. Ce gène est présent chez tous les Mammifères à l'exception de l'ornithorynque (Mammifère ovipare) dont le séquençage et l'analyse comparative du génome ont été réalisés récemment. On notera que cette espèce se singularise également par le fait qu'elle possède 10 chromosomes sexuels (5 chromosomes X et 5 chromosomes Y).

b) Gène SRY et masculinisation

- *Une mutation rendant SRY inopérant chez l'homme empêche la masculinisation.* On peut envisager qu'une mutation affectant SRY le rende inopérant et entraîne une féminisation. Cette éventualité a été confirmée dans des examens cliniques, par exemple celui d'une femme 46XY, chez qui l'examen cytogénétique montrait un chromosome Y qui paraissait entier. Le séquençage de l'ADN du gène SRY a révélé, au niveau de la boîte HMG, une mutation ponctuelle remplaçant une guanine par une adénine, ce qui entraînerait dans le peptide, le remplacement d'une méthionine par une isoleucine. La liaison du peptide à l'ADN en était perturbée, et sa fonction régulatrice annulée. Le sujet était le seul mutant parmi les 46XY de sa famille, qui étaient des hommes normaux (Mc Elreavey et coll., 1993).

Lorsque cette mutation est observée, homme ou souris mutés ne présentent aucune différenciation testiculaire, même vestigiale, ce qui signifie que la chaîne des régulations aboutissant à différencier un testicule n'a pas été amorcée.

- *Le gène Sry¹ transfecté dans des œufs de souris XX les masculinise.* Un gène de masculinisation Sry a été également identifié chez la souris et il ne s'exprime dans l'embryon mâle qu'au niveau des cellules somatiques des ébauches gonadiques, un ou deux jours avant les premiers signes de différenciation testiculaire.

Des œufs de souris ont été transfectés avec de l'ADN comprenant le gène Sry. Parmi la descendance génétiquement XX, deux cas de masculinisation ont été obtenus (Koopman et coll., 1991). Celle-ci était complète, les animaux étaient toutefois stériles, ce qui était prévisible et ne réduit pas la valeur du résultat. On sait en effet que la présence du chromosome X en plusieurs exemplaires empêche la spermatogenèse.

- *Le gène SRY ne suffit pas, à lui seul à assurer une spermatogenèse normale.* D'autres gènes sont nécessaires pour obtenir des gonades fonctionnelles capables de produire des gamètes. Ainsi Sry chez la souris et SRY chez l'homme régulent le point de départ de la différenciation testiculaire mais ne suffisent pas pour assurer une spermatogenèse complète.



L'environnement testiculaire défini par la présence de cellules de Sertoli est nécessaire pour le maintien d'une lignée de spermatogonies mais il ne suffit pas pour qu'elles deviennent des spermatozoïdes. Par exemple, chez les souris expérimentales chimères (voir § 12.3.4c) issues de la fusion de blastomères XX et XY, il existe des spermatogonies XX et X0 ; les premières dégénèrent, les secondes donnent des spermatocytes I qui ne dépassent pas la première métaphase de méiose, malgré l'environnement des cellules de Sertoli XY.

Des souris X0, porteuses d'un fragment de chromosome Y dont les gènes leur assurent un phénotype mâle, sont cependant stériles, alors même qu'elles achèvent leur spermatogenèse. Les spermatozoïdes sont anormaux, souvent diploïdes, il y a trouble de la méiose qu'on pourrait expliquer de deux façons : un chromosome Y entier est nécessaire pour servir de partenaire à X, afin que la méiose soit normale ; ou bien, il y aurait sur le chromosome, dans une autre région que celle du segment de chromosome transloqué, un gène impliqué dans la morphogenèse et le fonctionnement corrects du spermatozoïde.

1. Le gène s'écrit SRY pour l'homme et Sry pour les autres Mammifères.

c) Le gène *SRY* contrôle le développement testiculaire en synergie ou en opposition avec d'autres gènes portés par des autosomes ou par X

La protéine régulatrice *SRY* codée par ce gène déclenche une cascade de régulations affectant l'activité de gènes qui vont faire évoluer les ébauches sexuelles dans le sens d'une masculinisation. L'interprétation actuellement formulée pour rendre compte du processus de masculinisation implique non seulement le gène *SRY*, mais également des gènes situés sur les autosomes ou sur le chromosome X, qui s'expriment déjà dans les crêtes génitales (voir § 17.1.4). Dans la différenciation testiculaire deux de ces gènes interviendraient.

- *L'expression du gène autosomal SOX 9¹* est observée, chez l'homme, dans les cellules de Sertoli en cours de différenciation et **semble indispensable à la formation testiculaire**. Son équivalent chez la souris ne s'exprime au stade des crêtes génitales que dans les crêtes mâles, peu après *Sry*. Il code pour un facteur de transcription porteur d'une boîte HMG. Une copie supplémentaire de ce gène peut, en étant présent anormalement chez un individu génétiquement XX, induire la formation de testicules, même en l'absence de *SRY*. De même, ces derniers peuvent être induits chez des souris XX transgéniques pour *Sox 9* (Vidal et coll., 2001).

Une anomalie génétique chez l'homme se manifestant par l'existence d'une seule copie fonctionnelle de *SOX 9*, provoque de multiples atteintes organiques et 75 % des mâles génétiques XY qui en sont atteints développent un phénotype femelle ou hermaphrodite.

Sox 9 semble pouvoir remplacer *Sry* dans la différenciation des testicules ; il apparaît donc avec un rôle essentiel dans la différenciation mâle. Il est actif dans les testicules de tous les Vertébrés et serait peut-être plus ancien que *Sry/SRY* qui n'est présent que chez les Mammifères. Chez les Mammifères étudiés, *Sox 9* semble être activé par *Sry*, après quoi le produit de ce gène interviendrait dans la différenciation testiculaire en suivant une voie conservée au cours de l'évolution. Par ailleurs *Sox9* intervient dans l'activation du gène de l'hormone anti-mullérienne.

Récemment, l'inactivation par « knock-out » de *Sox9* dans les gonades de souris XY a permis de provoquer une inversion sexuelle complète chez celles-ci (Barriónuevo et coll., 2006).

- *Le gène autosomal SF1 (pour « Steroidogenic Factor 1 ») est activé par SRY et son expression est nécessaire pour la mise en place des gonades indifférenciées*. Le produit de ce gène est le facteur de transcription SF1 qui serait à l'origine de l'activation de plusieurs gènes impliqués dans la stéroïdogenèse. Ce facteur est exprimé pendant le développement testiculaire dans les cellules de Leydig pour activer les gènes codant pour les enzymes qui régulent la synthèse de la testostérone et dans les cellules de Sertoli pour activer le gène de l'hormone anti-mullérienne (AMH). Dans le dernier cas, il agit en synergie avec *Sox 9*. Chez l'homme, des indivi-

1. Les gènes *SOX* forment une famille dont les représentants possèdent tous une séquence codante pour la boîte HMG (*Sox* pour « *Sry* HMG box »).

des XY, chez qui SRY et SOX 9 sont normaux, mais qui sont hétérozygotes pour SF1, développent des gonades fibreuses et conservent leurs canaux de Müller.

Ce gène s'exprime aussi dans les crêtes génitales femelles indifférenciées ; son activité y décline et cesse rapidement.

• *FGF9 semble jouer un rôle primordial dans l'évolution des gonades en testicules.* Une étape importante dans la différenciation des gonades est la migration de cellules mésonéphrétiques dans la crête génitale. Ces cellules induisent la différenciation des cellules de l'épithélium gonadique en cellules de Sertoli qui exprimeront un programme génétique de type spécifiquement mâle. Il a été montré que la migration des cellules mésonéphrétiques dans la gonade XY est indirectement sous le contrôle de Sry (ou de Sox 9). Ces derniers induiraient les cellules des crêtes génitales à sécréter un facteur chimiotactique, le Fgf9, qui serait responsable de la migration des cellules mésonéphrétiques. En effet, des souris « knock out » pour le gène codant le Fgf9 sont presque toutes des femelles (Colvin et coll., 2001). En outre, non seulement le Fgf9 joue un rôle déterminant dans la formation des cordons testiculaires, mais encore, il stimule la division des cellules de Leydig et la différenciation des cellules de Sertoli.

Le mécanisme génétique de la différenciation testiculaire se révèle plus complexe qu'il n'y paraissait il y a quelques années et il n'est pas encore connu dans sa totalité. On sait par contre que la première manifestation visible en est la différenciation des cellules de soutien en cellules de Sertoli. Ces mêmes cellules de soutien formeront chez la femelle les cellules folliculeuses.

17.3.4 Rôle des cellules de Sertoli dans la différenciation du testicule

a) Formation de cordons testiculaires et inhibition de l'entrée en méiose

Le gène *Sry* s'exprime dès 10 jours et demi dans les crêtes génitales de la souris, au niveau des cellules de soutien. Il n'est actif dans aucun autre organe. Son expression diminue dès 12 jours et demi puis disparaît. Les cellules somatiques de soutien des cordons testiculaires se différencient en cellules de Sertoli. **Cette différenciation des cellules de Sertoli est indépendante de la présence de cellules germinales ; leur absence ne l'entrave pas.**

Dans une différenciation normale, les cellules de Sertoli vont inclure, au sein des cordons testiculaires, les cellules germinales primordiales qui ont gagné les crêtes génitales à partir de 10 jours et demi. Les cellules de Sertoli vont inhiber l'entrée en prophase de méiose des cellules germinales qui deviendront des spermatogonies. En effet, dans des lignées de souris où l'expression de *Sry* est simplement retardée et où les cellules de Sertoli ne se différencient pas, les cellules germinales primordiales XY peuvent entrer en prophase de méiose dans le testicule.



Le gène *Sry* a un rôle dans la différenciation des cellules de soutien en cellules de Sertoli. Ce rôle est montré par une étude des testicules de souris chimères mosaïques (Singh et coll., 1987). Les chimères formées résultent d'une combinaison, en quantité

inégaie, de blastomères XX et de blastomères XY, de telle façon que les animaux obtenus aient 90 % de cellules XX et 10 % de cellules XY. Les chimères se développent en mâles (stériles), avec des tubes séminifères où les proportions de formules XX et XY dans la population des cellules de Sertoli sont renversées par rapport au pourcentage initial. Celles-ci, moins nombreuses que la normale dans les tubes séminifères, sont en majorité de type XY (environ 80 %). Il faut cependant noter qu'un certain nombre est de type XX mais elles ne semblent pas se maintenir de façon stable chez l'adulte; cette dernière différenciation n'est pas comprise actuellement. Peut-être y a-t-il eu des communications intercellulaires avec des cellules XY et transfert d'information de cette manière.

b) Induction de la différenciation des cellules de Leydig

Certaines des cellules originaires du blastème mésonéphrétique sont induites par les cellules de Sertoli, pour former les **cellules de Leydig** dans le mésenchyme qui se développe entre les cordons testiculaires. Le gène *Sry* (souris) ou *SRY* (homme), ne s'exprime pas dans ces cellules. D'ailleurs, des cellules sécrétrices de testostérone peuvent aussi se développer accidentellement chez la femelle, par exemple chez des femmes âgées. À 12 jours et demi, chez la souris, on note, dans les cellules de Leydig, une synthèse d'hormones stéroïdes, par détection histoenzymologique de l'activité de la Δ 5-3-hydroxystéroïde-déshydrogénase, enzyme qui intervient dans la chaîne des synthèses d'hormones stéroïdes androgènes et œstrogènes, au cours de la transformation de prégnéolone et de déhydroépiandrostérone en androsténédione (voir § 3.2.1b et 17.4.1).

17.3.5 Différenciation de la gonade en ovaire

a) Rôle des cellules de soutien

En l'absence de *SRY*, les cellules de soutien ne deviennent pas des cellules de Sertoli et l'entrée en méiose des cellules germinales n'est pas inhibée, elles forment des ovogonies. La première poussée de cordons sexuels dégénère avec les gonies qu'ils contiennent. Dans la région corticale de la gonade, les jeunes ovocytes induisent le regroupement des cellules de soutien, devenues des **cellules folliculeuses**, ce qui aboutit à la formation de follicules. Les premiers apparaissent à 14 jours chez la souris.

Les cellules originaires du mésenchyme mésonéphrétique formeront les cellules de la thèque. À 16 jours, chez la souris, on y détecte les premières réactions histoenzymologiques positives révélant une activité de la Δ 5-3-hydroxystéroïde-déshydrogénase, et donc les premières synthèses d'hormones stéroïdes sexuelles qui seront ici des œstrogènes.

La différenciation des cellules de soutien présente une certaine labilité au début de la différenciation des gonades. On en a vu un exemple avec les souris chimères, c'est aussi ce qui est observé dans le cas du free-martinisme (voir encart 17.2).

b) Rôle possible des gènes *DAX1* et *WNT4*

La différenciation ovarienne n'est pas uniquement le résultat d'une absence de *SRY* ; elle aussi **serait régulée positivement**.

Des travaux récents ont révélé que, chez la souris, existait un **déterminant génique sexuel**, *Wnt4*, **nécessaire à cette différenciation**. Ce gène autosomal s'exprime au

niveau de la crête génitale indifférenciée et des gonades se différenciant en ovaires cependant que son expression cesse dans les gonades évoluant en testicules. Son inhibition pourrait être due chez le mâle à l'expression du gène *Sry* ou *Sox9*.

En cas de délétion de *Wnt4*, l'ovaire est mal différencié et exprime des caractères de masculinisation comme la production d'hormone anti-müllérienne ou d'enzymes de la synthèse de testostérone. Une anomalie génétique humaine chez des individus XY dont le gène *WNT4* est dupliqué, provoque une production en excès de DAX 1 et le développement de la gonade en ovaire (Jordan et coll., 2001), ce qui indique que WNT4 est responsable de l'activation de *DAX1*.

Le gène *DAX1*, porté par le bras court du chromosome X, paraît également jouer un rôle déterminant dans la différenciation ovarienne. Il s'exprime dans les crêtes génitales indifférenciées du mâle (de façon simultanée avec *SRY*) ou de la femelle. On constate que l'expression de *DAX1* persiste au cours du développement de l'ovaire, alors qu'elle disparaît dans le testicule en formation avec un décalage par rapport à l'expression déclinante de *SRY*. Diverses observations suggèrent que ce gène puisse jouer un rôle fondamental dans la détermination du sexe en étant capable d'inhiber les gènes impliqués dans la voie de la masculinisation. En effet, la mutation ou la délétion de ce gène entraîne chez la femelle la formation de gonades atrophiées. D'autre part, dans l'espèce humaine, il a été montré que la présence accidentelle de *DAX1* en double exemplaire sur le chromosome X, provoquait, chez des individus XY portant un *SRY* normal sur leur chromosome Y, une inversion sexuelle les transformant en femme XY. (Chez la souris, la présence de deux *Dax1* provoque seulement un retard du développement testiculaire).

L'une des hypothèses émises actuellement pour rendre compte de ces observations (fig. 17.7) est qu'il existerait chez les Mammifères un antagonisme entre *DAX1* et *SRY* (Jimenez et coll., 1996, Swain et coll., 1998). ***DAX1* pourrait coder un facteur anti-testiculaire** qui réprimerait ou entraverait l'expression des gènes activés lors de la différenciation testiculaire tels que *SFI*, *SOX9*, *AMH* et les gènes des enzymes de la stéroïdogenèse. *Dax1* a été cloné chez la souris. Il code pour un récepteur hormonal nucléaire. Il est d'abord exprimé dans les crêtes génitales des deux sexes, étant notamment nécessaire à la formation des testicules, comme *Sry* (Bauma et col. 2005). Il ne s'exprimera plus ensuite que dans l'ébauche femelle.

En l'absence de *SRY*, chez les individus XX, l'expression de *DAX1* porté par le chromosome X actif serait à elle seule capable d'inhiber les gènes nécessaires à la masculinisation des gonades, avec pour conséquence une différenciation ovarienne. **Chez les mâles, la présence de *SRY* aurait une activité inhibitrice sur l'expression de *DAX1***, permettant ainsi la différenciation testiculaire. Cette activité répressive serait inopérante en présence de deux copies actives de *DAX1* ou dans le cas d'une surexpression de *DAX1* due à deux copies de *WNT4*, ce qui expliquerait les cas d'inversion sexuelle évoqués précédemment.

L'existence de cette anomalie provoquant l'existence de femmes XY avait été, avant l'identification de *DAX1*, imputée à un facteur génique porté par X, désigné sous le terme de DSS (*Dosage Sensitive Sex reversal*). Il semblerait que *DAX1* puisse être assimilé à ce dernier.

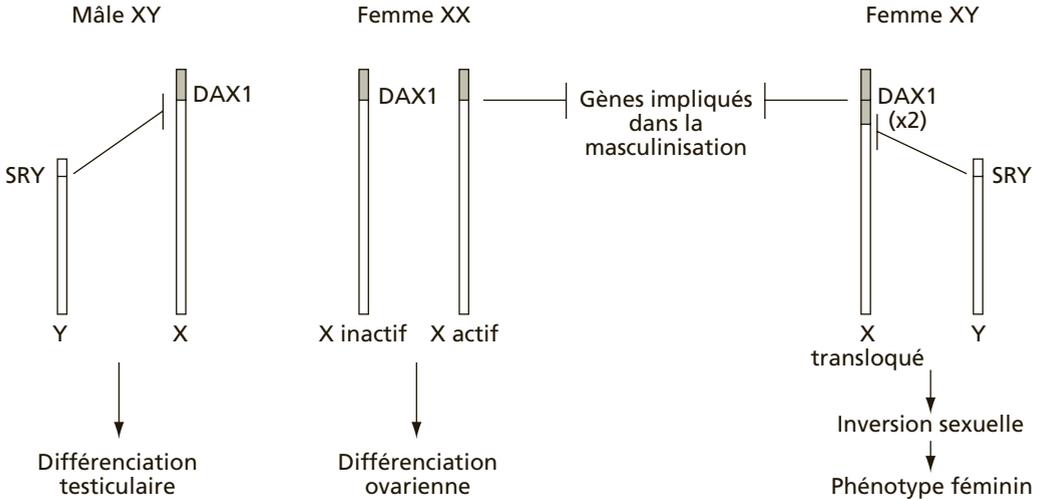


Figure 17.7 - Interprétation de la détermination du sexe chez l'homme faisant intervenir l'hypothèse d'un antagonisme entre *SRY* et *DAX1* (d'après les données de Jimenez et Burgos, 1998) (⊣ voie inhibitrice).

La chronologie du développement est importante : l'orientation vers l'un ou l'autre sexe est aussi soumise à des contraintes de temps étroites. Si, expérimentalement, l'expression de *Sry* est retardée chez la souris, *Sox9* n'est pas activé et la gonade deviendra un ovaire chez le sujet XY.

17.4 LES HORMONES DANS LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES MAMMIFÈRES (tableau 17.1)

Le sexe génétique est déterminé au moment de la fécondation et détermine la différenciation des gonades en testicules ou en ovaires. Il s'en suit, en général, la différenciation de l'embryon en un individu d'apparence mâle ou femelle. Cette évolution n'est pas automatique et dépend du bon fonctionnement des glandes endocrines sexuelles.

Les premières études sur le rôle des hormones dans la différenciation sexuelle résultent de l'étude d'anomalies constatées par des éleveurs (voir encart 17.3).

17.4.1 Activité hormonale des gonades embryonnaires

Le produit final des synthèses d'hormones stéroïdes sexuelles dépend des événements décrits plus haut qui induisent le tissu interstitiel de la glande à former **soit des cellules de Leydig soit des cellules de la thèque**. C'est la même chaîne de synthèses qui fournit la pregnénolone, la progestérone, l'androsténédione et finalement la testostérone. De même, l'androsténédione forme l'œstrone qui est le précurseur de la seconde hormone femelle, le 17- β -œstradiol. Les hormones mâles et femelles étant des produits de la même voie de biosynthèse avec à chaque étape, un système enzymatique différent, on comprend qu'un déséquilibre puisse modifier aisément la nature des synthèses finales.



ENCART 17.3 Les « Free-martins »

Lorsqu'une vache donne naissance à des faux-jumeaux de sexe différent, le mâle présente un développement sexuel normal, tandis que la femelle est souvent stérile, phénomène désigné sous le terme de « **free-martinisme** ». Les ovaires de cette dernière sont masculinisés, avec un cortex qui ne s'est pas développé et la présence de tubes séminifères réduits où la spermatogenèse est pratiquement inexistante. L'utérus est vestigial ou absent, le vagin rudimentaire et clos mais on observe un début de développement des vésicules séminales.

Il est apparu (Lillie, 1916), que sur 36 couples étudiés, le free-martinisme se manifeste dans les 33 cas où des anastomoses se sont développées précocement entre les vascularisations des deux placentas, lorsque les embryons mesurent environ 20mm. Dans ces conditions, les hormones sécrétées plus précocement chez le jeune mâle, dès le stade 25 mm, parviendront au fœtus femelle et inhiberont le développement de l'ovaire qui se produit normalement à un stade plus tardif. On sait maintenant que l'hormone responsable de cette masculinisation est l'hormone anti-müllérienne, sécrétée par les cellules de Sertoli et particulièrement abondante chez les bovidés.

– **Parabioses et greffes de crêtes génitales chez les Amphibiens.** Dans l'impossibilité de pratiquer sur les Mammifères des expériences reproduisant le free-martinisme, les recherches se sont portées sur des Amphibiens. Des méthodes de parabioses, qui consistent à souder flanc contre flanc des embryons au stade du bourgeon caudal montrent que, dans les associations hétérosexuelles, le développement ovarien est inhibé ; ces résultats sont plus marqués chez les Urodèles que chez les Anoures. Humphrey (1929) transpose chez l'axolotl des crêtes génitales d'un sexe génétique différent de celui de l'embryon receveur avant leur colonisation par les cellules germinales primordiales ; il apparaît que dans toutes les combinaisons réalisées, les crêtes génitales mâles après leur colonisation se différencient en testicules, quel que soit le sexe génétique des cellules germinales colonisatrices.

– **Emploi d'hormones sexuelles adultes.** Une autre approche a consisté à administrer des hormones sexuelles adultes à des embryons.

Chez les Amphibiens Anoures, des têtards d'une même ponte donnent tous des individus pourvus de testicules après la métamorphose ; la masculinisation des embryons femelles est donc complète (Gallien, 1944).

Chez les Mammifères, l'administration d'hormones mâles au cours de stades précoces de la gestation est source d'avortement. À un stade plus tardif où ces risques disparaissent, il n'a été possible d'agir que sur les conduits génitaux : les hormones femelles déterminent la persistance des canaux de Müller chez l'embryon de souris mâle ; les hormones mâles déterminent chez la femelle la persistance des canaux de Wolff et de Müller.

a) Dans les testicules embryonnaires

• **Les cellules de Leydig** du tissu interstitiel élaborent très tôt de la **testostérone**. L'activité des stéroïdes déshydrogénases y est très précoce (dès 12 jours 1/2 chez la souris).

Chez l'homme, on détecte la testostérone à partir de la 7^e semaine de gestation environ. L'activité endocrine mâle est intense. Par exemple, à partir de la 12^e semaine de

gestation et pendant près de deux mois, le niveau circulant de testostérone est, chez le fœtus humain de sexe mâle, proche du niveau normal le plus bas de l'homme adulte ; la moitié du volume du testicule est alors occupée par les cellules de Leydig. Le maintien du canal de Wolff est acquis dès le début de l'activité hormonale, grâce à la diffusion directe de l'hormone. Plus tard, par la voie sanguine, ces hormones converties en 5- α -dihydrotestostérone contribuent à la différenciation complète des voies mâles et de l'appareil copulateur.

Pendant la vie fœtale, le fonctionnement des cellules de Leydig est réglé par l'hormone gonadotrophique chorionique synthétisée dans le placenta. A la fin de la vie fœtale, cette fonction est relayée par la LH pour le restant de la vie. Les deux hormones possèdent le même récepteur membranaire.

• **Les cellules de Sertoli** sécrètent l'**hormone anti-müllérienne** après la formation des cordons séminifères. Cette activité se poursuit, chez l'homme, pendant toute la vie fœtale, et va en diminuant jusqu'à la puberté.

b) Dans l'ovaire embryonnaire

Il n'y a pas de sécrétion de testostérone. Des cellules du tissu interstitiel originaire du mésenchyme mésonéphrétique formeront les **cellules de la thèque**. Cependant, si dans des conditions anormales, des cellules de Leydig se différencient, il y aura synthèse de testostérone, le gène *SRY* n'étant pas nécessaire dans les cellules sécrétrices.

Les cellules somatiques de soutien, en l'absence de *SRY* se différencient en **cellules folliculeuses**.

Au moment de la puberté, les sécrétions d'œstrogènes seront actives dans ces deux types de cellules.

c) Chez les individus XY

Résultant notamment de l'activité du gène *SRY*, les gonades évoluent en testicules. Les cellules de Leydig et de Sertoli produisent alors respectivement, la testostérone et l'AMH, qui peuvent être considérées chez les Mammifères, comme les agents hormonaux de la différenciation masculinisante. En absence du chromosome Y, sous l'influence de certains gènes tel *DAX1*, les gonades et le sexe phénotypique évoluent vers la forme femelle.

17.4.2 Les récepteurs à la testostérone

Le mode d'action de la testostérone est assez bien connu. Cette hormone stéroïde pénètre dans les cellules mais n'agit sur les gènes que si elle peut auparavant se coupler avec une protéine réceptrice spécifique de l'hormone. Cette protéine est présente en abondance dans les cellules sensibles à l'hormone, ou cellules cibles. L'ensemble hormone-protéine est capable de reconnaître certains gènes et de réguler leur activité. Une cellule n'est sensible à la testostérone que si elle possède suffisamment de molécules de protéines réceptrices (environ 10 000 par cellule cible) ; les cellules des tissus non sensibles en possèdent peu.

Le gène codant pour le récepteur à la testostérone est localisé sur les chromosomes X. Ce gène est transmis par la mère à tous ses descendants, mâles ou femelles. Il en résulte que **la sensibilité à la testostérone est indépendante du sexe**.

Il existe un mutant déficient pour cette protéine : le mutant XX_0 . Cette déficience est transmise aux descendants et la moitié des mâles génétiques en est affectée : individus X_0Y . Ils développent des testicules mais ne sont pas capables d'utiliser la testostérone qui est sécrétée normalement puisqu'ils ne synthétisent pas la protéine réceptrice. Les individus présentent alors une anatomie et des organes génitaux externes d'apparence féminine mais sont dépourvus de tractus génital interne en raison de la production d'hormone anti-müllérienne testiculaire. Cette anomalie est appelée dans l'espèce humaine le **testicule féminisant**.

17.4.3 Différenciation mâle

Par diffusion locale et par la circulation sanguine, les hormones stéroïdes mâles gagnent les tissus sensibles et masculinisent un certain nombre d'organes cibles. La testostérone induit directement la différenciation des structures internes à partir du canal de Wolff : canaux déférents, vésicules séminales et épидидymes. Pour d'autres organes, la testostérone n'est qu'une pro-hormone qui doit, pour agir, être convertie en **dihydrotestostérone** sous l'effet d'une $5-\alpha$ -réductase : c'est le cas des organes génitaux externes et des glandes prostatiques. La déficience de conversion de la testostérone entraîne une féminisation partielle des organes génitaux et le maintien des testicules en position interne.

La testostérone agit également au niveau de l'hypothalamus embryonnaire pour y induire une synthèse continue de gonadolibérine(s) (voir § 2.5) qui active(nt) la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires. Cette sécrétion sera dès lors continue, alors qu'en l'absence de testostérone, elle reste cyclique chez la femelle.

L'étude de la différenciation des voies génitales mâles est étudiée ci-après, avec celle des voies femelles.

Au moment de la prépuberté, la sécrétion de testostérone augmente et a pour cible la plupart des organes. Elle active la spermatogenèse, modifie certains aspects anatomiques : taille, squelette, musculature, cordes vocales ; le volume de certains centres nerveux augmente. Certains aspects du comportement changent : agressivité, recherche de partenaire sexuel ; chez les Oiseaux, les chants saisonniers des mâles sont testostérone-dépendants.

17.4.4 Différenciation femelle

Chez les femelles, les cellules cibles de la testostérone sont sensibles comme chez le mâle, puisqu'elles possèdent les mêmes protéines réceptrices codées par des gènes portés par X. Comme il n'y a pas de sécrétions de testostérone et plus généralement d'hormones testiculaires, les ébauches ne seront donc pas induites à synthétiser des protéines « masculinisantes ». Le développement des organes cibles ne se fait donc pas dans le sens mâle. L'activité spontanément cyclique de l'hypothalamus n'est pas perturbée. Elle se matérialise par des cycles œstriens à la puberté.

Chez les embryons femelles, la progestérone joue cependant un rôle. Les sécrétions y sont plus actives chez la femelle néonatale que chez le mâle. Elles contrebalanceraient l'effet des hormones androgènes sécrétées par les surrénales qui existent chez les embryons des deux sexes. Elle jouerait notamment un rôle protecteur au niveau de l'hypothalamus, pour maintenir son activité cyclique.

Il existe aussi, chez la femelle de certaines espèces, des neurones et des centres dépendants du taux d'œstrogène, dont l'activité dépend de la saison et qui sont liés aux cycles de reproduction.

17.4.5 Déterminisme de la différenciation des voies génitales

Les mécanismes qui contrôlent le développement du tractus génital dans le sens mâle ou femelle, quand les gonades sont différenciées, sont étudiés d'après des travaux effectués sur les Mammifères.

a) Différenciation en l'absence de gonades (fig. 17.5 D)

Le rôle des gonades est étudié en suivant l'évolution des conduits génitaux en l'absence de ces gonades chez des fœtus castrés soit par irradiation aux rayons X chez la souris (Raynaud) soit chirurgicalement chez des lapins (Jost). Dans le dernier cas, le sexe du fœtus castré est reconnu en étudiant l'histologie de la gonade prélevée. La gestation dure 31 jours chez le lapin ; si l'embryon est castré au 19^e jour, les voies génitales acquièrent la morphologie femelle. Si l'opération n'est faite que le 23^e jour, elle sera sans effet sur l'évolution normale des voies génitales. Entre le 19^e et le 23^e jour, les effets sont intermédiaires. En conclusion, on constate que l'évolution des voies génitales dans le sens femelle est indépendante de la sécrétion d'hormone sexuelle femelle. Les hormones testiculaires ont, par contre, un rôle actif qui est double : elles contribuent au maintien des canaux de Wolff, elles entraînent la dégénérescence des canaux de Müller. Des expériences de greffes de testicules vont préciser leur mode d'action.

b) Greffes de testicules (Jost, 1949) (fig. 17.8)

Si un fragment de testicule est greffé près d'un ovaire d'embryon de lapin femelle, du côté de la greffe, les canaux de Müller régressent presque totalement et les canaux de Wolff persistent. Il y a un effet local de masculinisation. De l'autre côté, le tractus femelle subsiste. Le testicule fœtal exerce ses effets principaux sur des structures proches. Ce sont des événements locaux, ils ne sont pas dus à l'effet d'hormones circulantes. Par contre, en ce qui concerne les organes génitaux externes, les modifications sont sous contrôle d'hormones circulantes. Ceci explique des observations que l'on peut faire chez les intersexués dont une gonade est un ovaire et l'autre un testicule. Il y a par exemple une nette dissymétrie interne due aux effets locaux chez des free-martins avec un ovaire et un testicule, alors que les organes génitaux externes sont à peine transformés.

c) Implantation de microcristaux de testostérone (fig. 17.8)

Ces effets suggèrent l'existence d'une diffusion hormonale à partir du testicule.

Afin de préciser la nature de cette hormone, les expériences ont été reprises en implantant un microcristal de testostérone. Dans ces conditions on constate le maintien des canaux de Wolff et la masculinisation des organes génitaux externes. Par contre, la testostérone n'a pas eu d'effet sur les canaux de Müller qui subsistent.

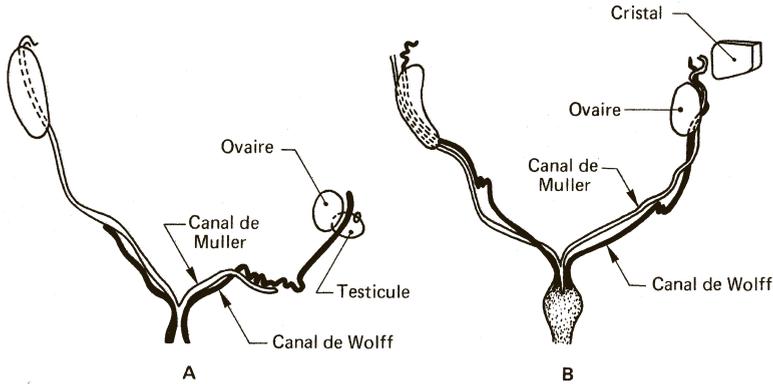


Figure 17.8 - Tractus génital de deux fœtus femelles de lapin, au 28^e jour de gestation, après implantation d'un testicule fœtal, le 20^e jour (A) ou d'un cristal de propionate de testostérone (B).

Dans le premier cas, les voies génitales du côté de l'implantation évoluent vers le type mâle, dans le second cas, le canal de Müller subsiste (d'après Jost, 1955, simplifié).

d) L'hormone anti-müllérienne

Le second facteur testiculaire a été découvert en 1973 par Josso et coll. C'est l'hormone anti-müllérienne, glycoprotéine de 140kDa constituée de deux sous-unités réunies par 4 ponts disulfures ; son site actif est un peptide de 109 acides aminés qui se clive au niveau des cellules cibles. Sa séquence est maintenant connue et son gène cloné. Il semble que SOX9, ainsi que SF1 agissant comme son co-facteur, peuvent intervenir dans l'activation du gène de l'AMH qui ne s'exprime que dans les cellules somatiques gonadiques. L'hormone est produite dans le testicule par les cellules de Sertoli immatures. Le taux de synthèse est à son maximum au moment de la régression des canaux de Müller, il chute à la puberté, mais des traces de l'hormone subsistent chez l'adulte. Les cellules de la granulosa chez la femme adulte synthétisent aussi cette hormone, mais en quantité 1000 fois moindre, à une époque où les oviductes et les ovaires sont devenus insensibles à son action.

Le rôle essentiel de cette hormone est de provoquer la régression des canaux de Müller chez le fœtus. Dans le cas des free-martins, c'est elle qui agit sur les ébauches de la femelle. L'hormone anti-müllérienne, chez les free-martins, attaque aussi la population germinale et masculinise l'architecture de la gonade en faisant apparaître des structures ressemblant à des tubes séminifères.

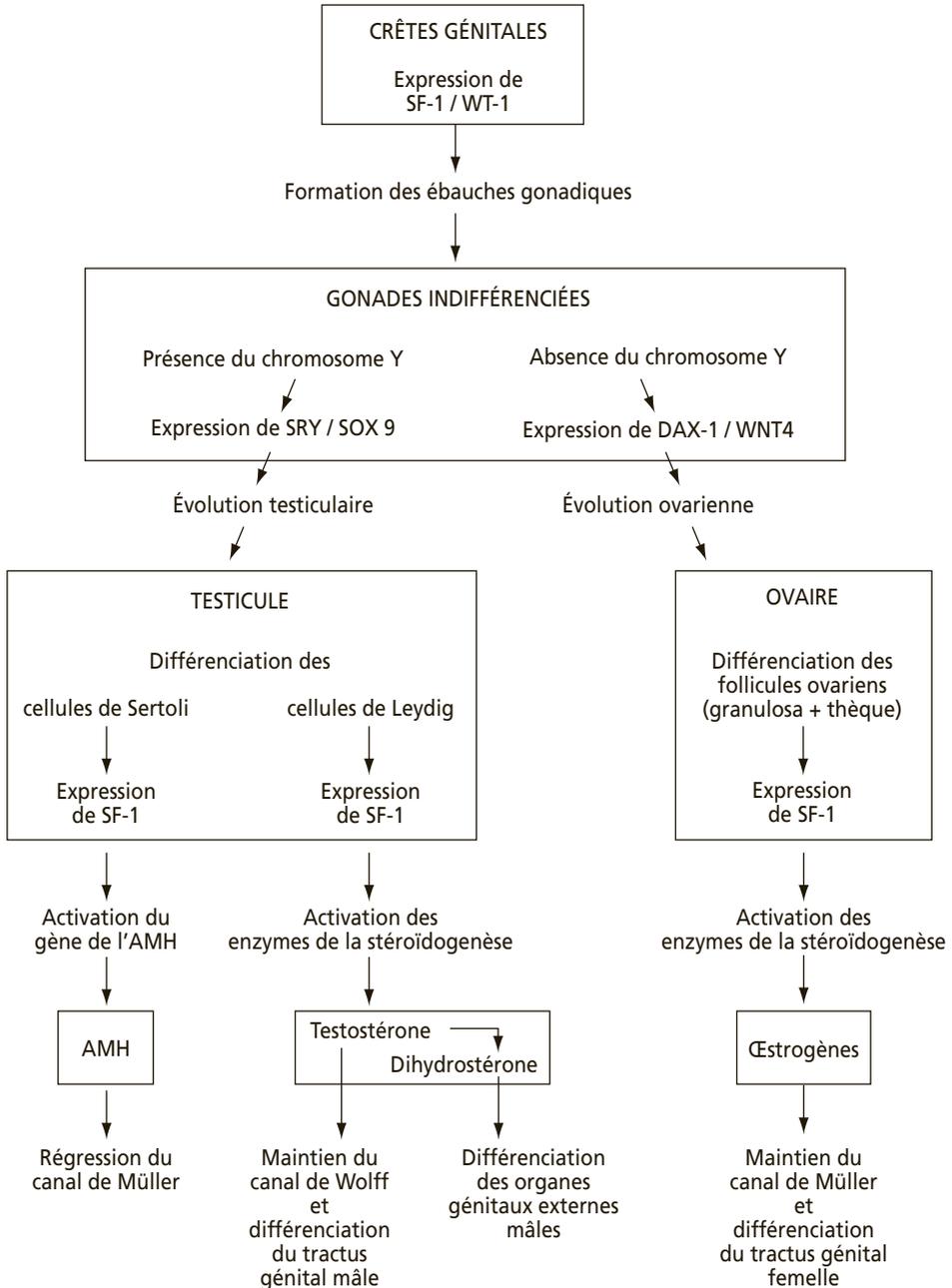
Les cas de free-martinisme ne se trouvent pratiquement que chez les ruminants, ce qui s'explique par l'abondance particulière de l'hormone anti-müllérienne dans ce groupe.

Compte tenu de ces modes d'action, il est normal qu'un embryon castré précocement acquière une morphogenèse femelle, quel que soit son sexe, puisque la source d'hormone stéroïde et d'hormone antimüllérienne est de toute façon absente.

L'ensemble des données actuelles concernant les déterminations géniques et hormonales de la différenciation sexuelle chez les Mammifères est schématisé dans le tableau 17.1.

17 • Différenciation des gonades et différenciation sexuelle

Tableau 17.1 – Schéma récapitulatif de la détermination du sexe chez les Mammifères



17.4.6 Mécanisme d'extinction d'un chromosome X chez la femelle des Mammifères

Chez les Mammifères, les femelles héritent de deux lots de gènes portés par les chromosomes X tandis que les mâles n'en possèdent qu'un, d'origine maternelle, à l'exception des quelques gènes situés sur Y qui ont leurs homologues sur X. Chez les Oiseaux, c'est le mâle qui est homozygote et qui bénéficie du double lot de chromosomes W.

Cette haploïdie propre à X expose le mâle à des déficiences résultant de mutations de gènes situés sur ce chromosome ; les femelles par contre peuvent en être protégées grâce à l'expression de l'allèle sain. C'est par exemple le cas pour le daltonisme ou l'hémophilie, résultats de la mutation de gènes localisés sur X ; ces pathologies sont transmises par la mère, mais s'expriment chez le mâle, porteur du seul X maternel. Cette différence se manifeste aussi par une mortalité mâle plus élevée à la naissance, une plus faible longévité, etc..

Compte tenu des différences de taille entre les chromosomes X et Y, le nombre de gènes portés par le chromosome X par rapport à celui de Y est considérablement plus important (2 à 3000 contre une dizaine). Si chez les femelles, les deux chromosomes X étaient actifs, les produits codés par les gènes seraient en double quantité, notamment par rapport aux produits présents dans les cellules chez un mâle qui ne comportent qu'un seul chromosome X, ce qui n'est pas le cas. En fait, il existe dans les cellules des femelles, une régulation permettant d'égaliser les productions géniques avec celles des mâles. Ceci est réalisé par l'inactivation de l'un des chromosomes X chez les femelles, phénomène désigné sous le terme de **compensation de dose**. Le chromosome inactivé est compacté et apparaît à l'observation sous la forme d'une masse d'hétérochromatine bien visible : le **corpuscule de Barr**.

Le choix dans chaque cellule femelle du chromosome inactivé, paternel ou maternel, est aléatoire et son mécanisme est mal connu. Les tissus de la femelle sont donc constitués d'une mosaïque, plus ou moins homogène suivant les espèces, de cellules où s'expriment soit les gènes X paternels, soit les gènes X maternels. Toute anomalie résultant d'une mutation portée par X se trouve compensée puisque, au niveau tissulaire les deux génomes s'expriment et, grâce aux communications intercellulaires, leurs effets sont uniformisés.

Le chromosome inactivé exprime dès le début du développement un gène *XIST/Xist* qui transcrit un ARN non codant ; cet ARN enrobe le chromosome X dans sa quasi totalité, il initie l'inactivation des autres gènes de X qui sont méthylés. Sur le chromosome X actif, c'est le promoteur de *XIST* qui se trouve méthylé et par conséquent inactivé. Dans les nucléosomes du chromosome inactivé, la méthylation de la lysine sur les histones H3 se réalise après l'enrobage du chromosome par l'ARN *Xist*. La transcription cesse alors, et la chromatine se modifie (désacétylation des histones, méthylation de certaines bases de l'ADN et fixation de protéines de liaison spécifiques de l'hétérochromatine), ce qui entraîne une inactivation irréversible des gènes de X, la modification des nucléosomes, la compaction de la chromatine et la formation des corpuscules de Barr. Chez la souris, un snARN non codant au niveau du chromosome X qui restera actif, serait responsable de la dégradation de l'ARN *Xist*.

La fonction inactivatrice de l'ARN *Xist* ne s'exerce pas uniquement sur X : on a pu greffer le segment contenant le gène *Xist* sur d'autres chromosomes de cellules embryonnaires mâles ; on constate que son pouvoir d'inactivation peut se manifester sur des autosomes.

Résumé

On distingue classiquement au cours de la différenciation sexuelle d'un Mammifère trois étapes majeures d'affirmation du sexe :

1) **L'établissement du sexe génétique**, régi au moment de la fécondation par l'apport d'un chromosome X ou Y apporté par le spermatozoïde fécondant. En effet, chez les Mammifères, c'est le mâle qui est hétérogamétique.

2) **L'établissement du sexe gonadique sous contrôle génétique** : la présence et l'expression d'un gène de différenciation testiculaire *SRY* porté par le Y provoquent une cascade d'activation d'autres gènes autosomaux se soldant par la différenciation de la gonade mâle. Chez les femelles, l'absence de ce gène associée à la présence de deux chromosomes X entraîne la différenciation ovarienne qui dépendrait aussi de l'activité des gènes autosomaux *DAX1* et *WNT4*.

3) **L'établissement du sexe phénotypique sous dépendance hormonale** : il se réalise en deux temps, l'un durant la vie fœtale avec la différenciation du tractus génital sous contrôle d'hormones produit par les gonades différenciées, l'autre lors de la puberté avec l'apparition de transformations physiques propres à chacun des sexes s'exprimant sous la forme des caractères sexuels secondaires. On peut schématiser ainsi la différenciation des gonades de Mammifères :

– Par attraction chimiotactique, des cellules germinales colonisent une ébauche mésodermique, les crêtes génitales, formées d'un cortex et d'un mésenchyme mésonephrétique.

– En présence du gène *SRY* porté par le chromosome Y, les cellules de soutien de la gonade embryonnaire originaires de la crête génitale se différencient en cellules de Sertoli, groupées en cordons testiculaires qui enserrant les spermatogonies qui ne se divisent pas et n'entrent pas en méiose. La différenciation de cellules de Leydig est induite. En l'absence de *SRY*, les cellules de soutien forment des follicules primordiaux, avec les cellules germinales qui entrent en méiose ; il ne se différencie pas de cellules de Leydig.

– Dans le premier cas (testicules), les cellules de Sertoli sécrètent l'hormone anti-müllérienne et les cellules de Leydig, la testostérone ; dans le second cas (ovaires), les sécrétions hormonales sont plus tardives, les tissus de la gonade évoluent en l'absence d'une régulation hormonale.

– Chez la femelle, les voies génitales évoluent spontanément, à partir des canaux de Müller qui persistent vers un phénotype femelle indifférencié.

– Chez le mâle, sous une double influence hormonale d'origine testiculaire, le canal de Müller dégénère (action de l'AMH) et le canal de Wolff se maintient en se différenciant selon le phénotype mâle (action de la testostérone).

Questions

- 17.1** À partir de quelles structures embryonnaires les gonades se différencient-elles chez les Vertébrés ?
- 17.2** Quelles sont les caractéristiques des cellules germinales primordiales ?
- 17.3** De quelles structures embryonnaires les gonocytes primordiaux sont-ils issus ?
- 17.4** À quoi correspond le stade gonade indifférenciée ?
- 17.5** Quelle différence peut-on relever en ce qui concerne le devenir du canal de Wolff entre les Vertébrés anamniotes et amniotes mâles ?
- 17.6** Quel est le facteur endocrinien responsable de la régression du canal de Müller chez les individus mâles ?
- 17.7** Comment peut-on expliquer l'existence d'individus de phénotype masculin ayant une formule chromosomique 46 XX ?
- 17.8** Le gène SRY est-il le seul responsable de la détermination sexuelle de la différenciation gonadique mâle chez les Mammifères ?
- 17.9** Le déterminisme du sexe est-il uniquement lié à un déterminisme chromosomique chez tous les Vertébrés ?
- 17.10** Quelles sont les trois étapes majeures dans la mise en place du sexe chez les Mammifères ?

Réponses page 394

RÉPONSES AUX QUESTIONS

Chapitre 1

1.1 Lors de la prophase de division I de méiose qui est longue, comparée à la durée d'une prophase de mitose, se produit un appariement des chromosomes homologues au cours duquel peuvent s'effectuer des « crossing-over ». A la métaphase, les chromosomes homologues constitués chacun d'une paire de chromatides se répartissent de part et d'autre de la plaque métaphasique alors que dans une mitose normale, c'est au niveau de la plaque elle-même que se disposent les chromosomes. Les chromosomes anaphasiques de la prophase I de méiose comporteront deux chromatides et un centromère, à la différence de la mitose où les chromosomes anaphasiques seront constitués chacun d'une chromatide et d'un centromère fils suite au clivage du centromère initial.

1.2 L'existence du phénomène de « crossing-over » lors de la prophase de division I et la répartition aléatoire des chromosomes homologues parentaux entre les cellules filles durant la métaphase I.

1.3 Leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacynèse.

1.4 Le cycle vital d'une espèce est l'ensemble des étapes qui conduisent, à partir d'œufs issus d'individus d'une génération donnée, à la formation d'autres œufs qui donneront naissance à des individus formant la génération suivante.

1.5 Le cycle vital chez les Métazoaires est diplobiontique, c'est-à-dire que la phase haploïde (haplophase) est réduite aux gamètes seulement, les individus diploïdes produisant ces derniers constituent la diplophase du cycle.

1.6 La multiplication asexuée, qui se réalise en dehors d'une production de gamètes issus de la lignée germinale, peut générer de nouveaux individus. Si elle permet de coloniser rapidement un milieu aux caractéristiques stables, elle ne permet pas en revanche la diversité génétique et entraîne une fragilité des espèces face à des modifications environnementales éventuelles. Ce mode de reproduction n'est pas exclusif de la reproduction sexuée, ce qui permet de déjouer les risques que pourrait entraîner pour la survie de l'espèce, l'existence de la seule multiplication asexuée.

1.7 L'ovotestis a pour synonyme glande hermaphrodite et correspond donc à une gonade ayant une double potentialité sexuelle.

Chapitre 2

2.1 Rôle de soutien comme élément structurant de la paroi du tubule séminifère dans laquelle sont nichées les cellules germinales ; rôle de protection immunologique par l'établissement de la barrière hémato-testiculaire ; rôle trophique vis-à-vis des cellules germinales ; rôle endocrine avec la production de l'hormone anti-mullérienne (AMH) et de divers facteurs protéiques (activine, inhibine...) ; rôle dans la spermiogenèse en participant à la résorption du surplus cytoplasmique des spermatozoïdes en cours de différenciation.

2.2 La libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubules séminifères.

2.3 Cette étape de la spermatogenèse correspond à la cytodifférenciation des spermatozoïdes en spermatozoïdes. Les événements principaux de cette transformation consistent en la formation d'un acrosome, la différenciation d'un appareil locomoteur flagellaire, une condensation du noyau et une élimination d'un surplus cytoplasmique.

2.4 Durant toute la vie sexuelle de l'individu, c'est-à-dire depuis sa puberté jusqu'à sa mort.

2.5 C'est au cours de leur transit dans l'épididyme que les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité.

2.6 Durant leur séjour dans l'épididyme, les spermatozoïdes subissent une maturation les rendant potentiellement aptes à devenir féconds. Outre l'acquisition de leur mobilité et de leur morphologie définitive, ils sont affectés par divers remaniements moléculaires au niveau membranaire (changement des compositions lipidiques et protéiques, modifications post-traductionnelles...). L'ensemble de ces phénomènes constitue l'acquisition de la fécondance qui ne signifie pas pour autant que les spermatozoïdes soient, à cette étape de leur maturation, capables de réaliser une fécondation.

2.7 Une forte élévation de température corporelle ou du milieu environnant, des radiations ionisantes ou électromagnétiques, des avitaminoses, des perturbateurs endocriniens comme certains pesticides ou des phtalates.

2.8 La fonction majeure des cellules de Leydig est la production de testostérone. Ces cellules jouent également un rôle de contrôle de l'activité des cellules de Sertoli par la sécrétion de différents facteurs paracrines.

2.9 L'axe hypothalamo-hypophysaire contrôle le fonctionnement des cellules somatiques testiculaires qui entretiennent entre elles et avec les cellules germinales un jeu d'interactions complexes. Ainsi, la LH en synergie avec l'inhibine produite par les cellules de Sertoli sous l'influence de la FSH, stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig. Cette hormone agit à son tour directement sur les cellules germinales et leur évolution.

2.10 Chez les Mammifères, au cours de leur transit dans les voies génitales femelles, les spermatozoïdes subissent des modifications qui dévoilent leur capacité à être féconds. Seuls les spermatozoïdes ayant été capables peuvent assurer une fécondation. La capacitation s'exprime au niveau des spermatozoïdes par des modifications affectant leurs constituants membranaires et par un changement de leur mode de locomotion.

Chapitre 3

3.1 C'est le gamète femelle, cellule qui est pondue par l'ovaire et qui sera fécondée. Selon les espèces, cette cellule peut se trouver à différents stades de la méiose (ovocyte I chez les Insectes ou les Annélides, ovocyte II chez les Vertébrés, ovotide chez les Echinodermes).

3.2 À l'exception des Mammifères vivipares, tous les Vertébrés possèdent un ovaire de type creux à l'intérieur duquel les cellules germinales, à différents stades de leur évolution, sont appendues, enveloppées de structures membranaires et cellulaires.

3.3 Chez les Vertébrés, l'ovule est un ovocyte II bloqué en métaphase de division II de méiose.

3.4 Dans l'espèce humaine, la multiplication ovogoniale se réalise durant la vie embryonnaire et fœtale d'un individu de sexe féminin entre la 5^{ème} et la 14^{ème} semaine de gestation environ.

3.5 L'atrésie correspond à un phénomène de dégénérescence folliculeuse se produisant durant la vie d'une femelle de Mammifère. Deux pics de dégénérescence existent chez l'espèce humaine, l'un durant la période périnatale et l'autre lors de la ménopause, ce dernier aboutissant à la disparition complète des follicules ovariens.

3.6 La vitellogenèse correspond à la production par l'organisme maternel et au stockage au sein du cytoplasme ovocytaire de substances de réserve protéiques et lipidiques sous la forme de vitellus. Ce phénomène s'observe selon une importance variable chez les espèces ovipares.

3.7 A chaque cycle, la FSH stimule la prolifération des cellules folliculeuses et la formation de la granulosa dans certains follicules qui deviennent des follicules de de Graaf.

3.8 Après la ponte ovulaire, les cellules de la granulosa se chargent en lipides et forment le corps jaune. Ces cellules dites lutéales sécrètent des hormones stéroïdes (principalement la progestérone) et diverses autres substances (hormones peptidiques et facteurs de croissance). Ce corps jaune ou corps progestatif disparaît s'il n'y a pas de fécondation et se maintient dans le cas inverse sous l'action de la gonadotrophine chorionique d'origine trophoblastique. Par la suite, la production hormonale du corps jaune est relayée par les hormones d'origine placentaire.

3.9 La décharge ovulante correspond au milieu du cycle ovarien, à la libération massive de LH et de FSH à partir de l'antéhypophyse ce qui provoque la ponte ovulaire.

3.10 Sous l'influence de la LH, les cellules de la thèque interne produisent des hormones androgènes qui seront transformées en œstrogènes dans les cellules de la granulosa par l'intermédiaire d'une activité aromatasé contrôlée par la FSH. Outre les œstrogènes (dont l'œstradiol), les cellules folliculeuses produisent également des substances protéiques (activine et inhibine) exerçant un pouvoir de contrôle sur l'activité antéhypophysaire.

3.11 Dans un chromosome donné, le segment d'ADN contenant un grand nombre de copies du gène codant pour le précurseur des ARN ribosomiques, est désigné sous le terme d'organisateur nucléolaire. Chez les Amphibiens, au stade pachytène de la prophase de division I de méiose, cette séquence de gènes répétés est sélectivement dupliquée un grand nombre de fois donnant naissance à de nombreux organisateurs au sein du noyau. Ces derniers seront à l'origine d'un nombre équivalent de nucléoles résultant de leur transcription.

Chapitre 4

4.1 Le contact du spermatozoïde avec l'une des enveloppes de l'ovule provoque au niveau du gamète mâle une suite d'échanges ioniques membranaires et une libération de Ca^{++} qui ont pour conséquence une fusion plus ou moins partielle de la membrane acrosomique externe avec la membrane plasmique. Le contenu de la vésicule acrosomique peut ainsi être libéré et permettre une digestion enzymatique de l'enveloppe ovulaire.

4.2 Le phénomène de capacitation ayant lieu lors du transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle des Mammifères, est donc associé à un mode de fécondation interne et non externe.

4.3 Des liaisons faibles faisant intervenir des molécules membranaires spermatisques (protéine de 250kDa, SED1) avec des constituants de la zone pellucide se produisent dans un premier temps. Mais la fixation spécifique du spermatozoïde à la zone pellucide s'effectue au niveau de ZP3. Elle se réalise chez la souris par des galactosyltransférases ancrées dans la membrane plasmique périacrosomique du spermatozoïde qui reconnaissent et se lient à des résidus N-acétyl-glucosamine portés par ZP3.

4.4 Chez de nombreuses espèces, dont l'oursin, dans l'ovule qui vient d'être fécondé, les granules corticaux fusionnent avec la membrane plasmique, ce qui libère leur contenu entre celle-ci et la membrane vitelline. Cette dernière subit des transformations sous l'effet des substances issues des granules corticaux et devient la membrane de fécondation. Celle-ci, décollée de la membrane plasmique, en est séparée par un espace périvitellin.

4.5 Les fertilisines sont des substances libérées lors de la ponte ovulaire qui jouent un rôle dans l'attraction des gamètes mâles (exemple des fertilisines diffusant à partir de la gangue des ovules d'oursin). La fertiline est le nom donné à des molécules pouvant former des hétérodimères présents à la surface membranaire des spermatozoïdes de certaines espèces et qui interviennent dans les processus de reconnaissance et de liaison au gamète femelle.

4.6 Lors de leur capacitation, les spermatozoïdes voient leur comportement locomoteur modifié, leur trajectoire initialement linéaire devenant plus ou moins circulaire et erratique. Ce changement du mode de déplacement des spermatozoïdes traduit leur état hyperactivé. De même dans les espèces à fécondation externe, la

diffusion dans l'eau de mer de constituants de l'enveloppe ovulaire, tel le resact, discipline le déplacement désordonné des spermatozoïdes.

4.7 Les transformations causées aux enveloppes ovulaires à la suite de la fécondation (changement de texture, destruction des sites de fixation des spermatozoïdes) ou subies par la membrane plasmique de l'ovule (modification du potentiel membranaire) constituent des barrières contre la polyspermie en empêchant la fixation et/ou la pénétration de spermatozoïdes supplémentaires.

4.8 Après sa pénétration dans l'ovule, le noyau spermatique subit un gonflement auquel sont associées une décondensation de la chromatine et une duplication d'ADN. Ce n'est que lorsque cette dernière est également accomplie dans le pronucleus femelle que peut se produire l'amphimixie suite à la rencontre des deux pronuclei.

4.9 Modification physique de la membrane et du cortex de l'œuf, flux ioniques et dépoléarisation membranaire.

Chapitre 5

5.1 Un œuf oligolécithe est caractérisé par la présence, en quantité modérée, de vitellus qui se répartit de manière homogène dans l'ensemble du cytoplasme ovocytaire.

5.2 Plus la quantité de vitellus est importante et plus les divisions cellulaires de la segmentation sont difficiles à se réaliser, les réserves présentes entravant la mise en place de la machinerie mitotique (fuseau de division par exemple). Ainsi peut-on observer un retard du rythme des divisions voire même une absence de division dans les régions riches en vitellus.

5.3 Ce type de segmentation appelé également méroblastique s'observe dans les taxons où il existe de grandes quantités de vitellus. On le rencontre chez les espèces ayant des œufs centrolécithes (ex. : Insectes) ou télolécithes (ex. : Mollusques Céphalopodes, Sauropsidés, Monotrèmes).

5.4 Cette segmentation est observée chez les Mammifères vivipares et les Nématodes.

5.5 Le blastodisque, dit encore cicatricule, est le nom donné au disque germinatif, c'est-à-dire la zone cytoplasmique dépourvue de réserves dans laquelle se trouve initialement le noyau de l'ovocyte et qui sera le siège des divisions de segmentation. Le blastoderme correspond au blastodisque en cours de segmentation.

5.6 La gastrulation consiste en la différenciation et en la mise en place de feuillets embryonnaires dont l'agencement préfigure le plan d'organisation selon lequel s'édifiera le futur organisme adulte. Au cours des mouvements morphogénétiques affectant les territoires cellulaires, se met en place une cavité correspondant au tube digestif primitif. Le nom donné à cette période essentielle du développement provient du terme « gaster », c'est-à-dire estomac en grec.

5.7 Par invagination ou embolie (ex. : pénétration du feuillet endodermique à l'intérieur de l'embryon chez les Amphibiens et les Oursins) ; par épibolie (ex. : expansion

de l'ectoderme qui recouvre les autres cellules chez les Amphibiens ou les Oursins) ; par immigration (ex. : migration individuelle de cellules à l'intérieur de l'embryon, telles les cellules du mésenchyme primaire chez les Oursins) ; par délamination (ex. : formation d'un feuillet interne par doublement ou migration d'une assise cellulaire comme c'est le cas pour la mise en place de l'endoderme chez les Cnidaires ou celle de l'hypoblaste secondaire chez les Oiseaux).

5.8 L'orifice du blastopore ou sa région peut correspondre ou participer à la formation chez l'adulte, soit de l'anus chez les Deutérostomiens, soit de la bouche chez les Protostomiens.

5.9 La formation d'une cavité cœlomique ne s'effectuant qu'à partir du feuillet mésodermique, les Diploblastiques ne peuvent pas posséder cette structure en raison de l'absence de ce feuillet.

5.10 Chez les Vertébrés anamniotes, selon les taxons, des structures annexes peuvent se différencier tels des sacs vitellins (ex. : poisson-zèbre) ou des structures placentaires (certains Sélaciens). De véritables annexes embryonnaires (vésicule vitelline, amnios, allantoïde) n'apparaissent que chez les Vertébrés amniotes.

Chapitre 6

6.1 Les œufs des oursins sont oligolécithes.

6.2 A de rares exceptions près, la segmentation est totale, radiaire et inégale.

6.3 Les micromères sont à l'origine des cellules du mésenchyme primaire qui édifieront les éléments cytosquelettiques larvaires.

6.4 La larve pluteus.

6.5 C'est à partir de bourgeonnements au niveau de la paroi antéro-latérale de l'archentéron constitué par du matériel endomésodermique que se forment les vésicules cœlomiques.

6.6 Ce mode de formation du cœlome est dit par entérocoelie.

6.7 C'est au moment de leur métamorphose qu'en contact avec le substrat, les larves jusqu'alors pélagiques, acquièrent la symétrie radiaire d'ordre cinq (symétrie pentaradiée) caractéristique des Echinodermes. Ainsi observe-t-on au cours du développement des espèces de ce taxon une succession de plans d'organisation basés sur une symétrie axiale puis bilatérale et enfin radiaire pentaradiée sur laquelle peut se superposer éventuellement une symétrie bilatérale.

Chapitre 7

7.1 Les œufs des Insectes sont du type centrolécithe.

7.2 La segmentation de l'œuf d'Insecte est partielle et périphérique.

7.3 L'identification de la future région antérieure peut être faite de manière externe grâce à la présence au niveau du chorion de deux appendices et d'un micropyle par lequel les spermatozoïdes peuvent accéder à l'ovule. De plus, il est possible d'iden-

tifier précocement des axes polarités en révélant par des méthodes d'hybridation *in situ* la présence de transcrits d'origine maternelle distribués de manière différentielle selon ces axes (exemple de *bicoid* et de *nanos*).

7.4 Le plasme polaire correspond à la région cytoplasmique postérieure de l'œuf dans laquelle sont localisés des déterminants cytoplasmiques qui, lorsqu'ils seront redistribués dans les cellules polaires lors du stade de la cellularisation du blastoderme, conféreront à ces dernières une destinée germinale.

7.5 Les énergides correspondent aux noyaux provenant des premières divisions successives de la segmentation et qui sont disséminés dans la masse du vitellus, entourés d'une étroite couronne de cytoplasme dépourvu de réserves.

7.6 L'ensemble des territoires organogènes de l'embryon constitue la bandelette germinative.

7.7 L'acron, où s'ouvre l'orifice buccal, et le telson, au niveau duquel se situe l'anus, situés respectivement aux extrémités antérieure et postérieure du corps, ne sont pas des métamères.

7.8 Le tube digestif des Insectes est subdivisé en 3 parties. Les deux régions distales sont d'origine ectodermique et possèdent un revêtement chitineux. Seule la partie centrale formant l'intestin moyen est d'origine endodermique et provient de la jonction de deux territoires invaginés à partir de chacune des extrémités du corps. Dépourvu de chitine, c'est à son niveau que s'effectueront les fonctions d'absorption.

7.9 La drosophile possède une chaîne nerveuse ventrale. C'est donc, comme la majorité des Invertébrés, un Hyponeurien. Cette chaîne se forme à partir de la migration de neuroblastes issus du feuillet neuroectodermique ventral.

7.10 6/7 segments céphaliques, 3 segments thoraciques et 8/9 segments abdominaux.

Chapitre 8

8.1 Ce sont des œufs du type hétérolécithe.

8.2 À la suite de la formation de la membrane de fécondation, l'œuf fécondé libéré de ses attaches à ses enveloppes, en flottant dans le liquide périvitellin, peut s'orienter selon les lois de la pesanteur, avec son pôle végétatif riche en vitellus dirigé vers le bas.

8.3 Entre 1 et 2h après la fécondation, se produit un basculement de la zone corticale de l'hémisphère animal pigmenté en direction du point d'entrée du spermatozoïde, ce qui entraîne la formation du croissant dépigmenté qui marque la future région dorsale de l'embryon. Le plan dans lequel l'amplitude du déplacement du pigment est maximum et qui est défini par l'axe pôle animal/pôle végétatif et la traînée spermatique, coïncide avec le plan de symétrie bilatéral selon lequel s'édifiera l'embryon.

8.4 Au bout de 72h. Chez la plupart des Amphibiens, un intervalle d'environ 24h sépare chacune des grandes étapes de l'embryogenèse précoce (segmentation, gastrulation, neurulation).

8.5 Mouvement d'involution et de convergence du matériel précordal et cordal, mouvement de divergence du mésoderme des lames latérales.

8.6 Une intercalation radiaire affecte l'ectoderme favorisant le recouvrement de l'embryon par ce feuillet (épibolie). Une intercalation latérale se manifeste au sein du mésoderme cordal, ce qui l'amène à former un cordon médio-dorsal s'allongeant selon l'axe antéro-postérieur.

8.7 Le mésoderme para-axial est constitué par deux bandelettes mésodermiques situées de part et d'autre de la corde qui seront à l'origine des somites à partir desquels s'individualiseront les territoires du sclérotome, myotome et dermatome.

8.8 L'encéphale est tout d'abord constitué par trois vésicules (prosencephale, mésencephale et rhombencéphale), la première et la dernière se divisant, il se forme ensuite cinq vésicules (télencéphale, diencéphale, mésencephale, métencéphale et myélocéphale).

8.9 Les cellules des crêtes neurales sont à l'origine des tissus mésenchymateux à partir desquels se formeront de nombreux constituants de la tête et du cou (majorité des os du crâne, derme de la face, ganglions crâniens, tissu conjonctif des glandes salivaires, lacrymales, thyroïde, hypophyse...), de divers composants du système nerveux périphérique (ganglions rachidiens, chaînes ganglionnaires sympathique et orthosympathique, cellules de Schwann...), des cellules chromaffines des médullosurrénales, de la majorité des cellules pigmentaires.

Chapitre 9

9.1 Les œufs sont du type télolécithe.

9.2 La segmentation est, comme chez tous les Sauropsidés, partielle et de type discoïdal.

9.3 L'ovule est formé par ce qui est désigné dans le langage courant sous le terme de « jaune ».

9.4 L'hypoblaste est une structure transitoire qui n'entre pas dans la constitution de l'embryon et ne peut pas être considéré comme un élément organogène à la différence de l'ectoderme, du mésoderme et de l'endoderme.

9.5 21 jours.

9.6 C'est à partir de la 20^{ème} heure d'incubation qu'apparaît toutes les 90 min environ une nouvelle paire de somites.

9.7 Outre le fait que le développement des Amphibiens s'effectue dans un milieu aquatique, en absence de mise en place d'annexes embryonnaires, les différentes étapes de leur embryogenèse se réalisent de manière successive alors que chez les Vertébrés amniotes, dont les Oiseaux, des chevauchements se produisent entre gastrulation, neurulation et organogenèse.

9.8 Cette structure, encore appelée chorion, correspond à un double feuillet constitué par de la somatopleure extra-embryonnaire accolée à de l'ectoderme extra-embryonnaire.

9.9 La présence d'une cavité amniotique permet un développement embryonnaire *in ovo* autorisant un cycle vital qui s'abstrait totalement du milieu aquatique et qui peut intégralement se dérouler dans un milieu aérien terrestre.

9.10 L'allantoïde a trois rôles : 1° Respiratoire : la splanchnopleure vascularisée qui double l'allantoïde est appliquée contre la séreuse et constitue avec cette dernière un allanto-chorion plaqué contre la coquille poreuse ce qui permet des échanges respiratoires ; 2° Excréteur : les déchets du métabolisme azoté éliminés par le rein sont stockés à son niveau ; 3° Trophique : l'allanto-chorion est un site de mobilisation des sels de Ca^{++} de la coquille et une résorption de l'ovalbumine s'effectue au niveau de la paroi de l'allantoïde.

Chapitre 10

10.1 La zone pellucide et la corona radiata.

10.2 Jusqu'au stade 8 à 16 cellules selon les espèces de Mammifères, la morula est constituée de blastomères plus ou moins sphériques ne possédant entre eux que des contacts ponctuels. Lors de la compaction, sans division supplémentaire, les cellules s'agrègent brutalement, ce qui les rend peu distinctes individuellement ; à l'achèvement de ce phénomène elles ont acquis une polarité.

10.3 Le blastocyste primaire possède une assise cellulaire externe, le trophoctoderme, délimitant une cavité, le lécithocèle. A un pôle du blastocyste dit pôle embryonnaire, est accolé au trophoctoderme, en position interne, le bouton embryonnaire (ou masse cellulaire interne) qui constitue le matériel cellulaire organogène.

10.4 Chez l'espèce humaine, lors de l'éclosion, le blastocyste se dégage de la zone pellucide et se fixe à la paroi utérine par son pôle embryonnaire vers le 5^{ème} jour après la fécondation.

10.5 Dans un premier temps l'embryon est constitué par deux ensembles cellulaires, l'épiblaste et l'hypoblaste formés à partir de la masse cellulaire interne. L'embryon est dit didermique. Ce n'est qu'à la gastrulation, vers le 15^{ème} jour après la fécondation chez l'espèce humaine, que se réalise la mise en place des trois feuilletts embryonnaires, ectoderme, mésoderme et endoderme aboutissant à la formation d'un embryon tridermique.

10.6 Les œufs des Mammifères vivipares sont alcithes et ne possèdent pas d'annexe embryonnaire renfermant des réserves vitellines. Par homologie, le lécithocèle secondaire peut être comparé à une vésicule vitelline, quoique dépourvu de réserves. Cette vésicule vitelline possède une importance variable selon les taxons. Généralement réduite chez les Mammifères placentaires, elle intervient, chez les Marsupiaux, par suite de son contact avec le chorion, dans l'apport de substances nutritives aux embryons. En revanche, les Monotrèmes possèdent une vésicule vitelline analogue à celle des Sauropsidés.

10.7 Les couches trophoblastiques (cytotrophoblaste et syncytiotrophoblaste) doublées par de la somatopleure extra-embryonnaire, le tout formant le chorion, constituent la partie placentaire fœtale.

10.8 Un placenta est indécidué si au cours de l'implantation du blastocyste et lors de sa formation du placenta ne se produit pas de corrosion des parois des vaisseaux de l'endomètre utérin maternel, l'élimination du placenta à la parturition ne s'accompagne pas de saignement.

10.9 Amniogenèse par plissement (Carnivores, Ongulés, Lagomorphes et Lémuriens), par cavitation (Insectivores, Chiroptères et Primates supérieurs), par cyste ectochorial (Rongeurs).

10.10 Chez les Primates, la placentation est de type allanto-chorionique et hémochorial. De plus, le placenta est qualifié de discoïdal en raison de la disposition des villosités placentaires.

Chapitre 11

11.1 Ce sont des gènes maternels dont les produits de transcription s'accumulent dans l'ovocyte et qui ne seront traduits qu'une fois la fécondation réalisée.

11.2 S'expriment successivement dans le temps, les gènes « gap », les gènes « pair rule » I et II et les gènes de polarité segmentaire.

11.3 Le terme homéogène désigne des gènes qui possèdent une séquence nucléotidique, l'homéoboîte qui code, au niveau de leurs produits, pour une séquence d'environ 60 acides aminés appelée homéodomaine qui constitue un site de liaison à l'ADN. Les gènes homéotiques sont des homéogènes dont la mutation provoque un phénomène d'homéosis, c'est-à-dire la mise en place d'organes normaux dans des positions corporelles anormales. Tous les gènes homéotiques sont des homéogènes, l'inverse n'étant pas vrai.

11.4 Le système Delta/Notch et le système éphrine/Eph.

11.5 Les cellules nourricières sont des cellules d'origine germinale, souvent reliées à l'ovocyte par des ponts cytoplasmiques, alors que les cellules folliculeuses sont de nature somatique.

11.6 A la différence de la mise en place de l'axe antéro-postérieur qui relève des distributions différentielles de transcrits issus des cellules nourricières, l'axe dorso-ventral est sous la dépendance de signaux moléculaires échangés entre l'ovocyte puis les cellules du blastoderme et les cellules folliculeuses.

11.7 Les gènes de polarité segmentaire interviennent par leurs produits dans les signaux échangés entre cellules contiguës de la blastula cellularisée. Ce sont les voies de signalisation Wnt et Hedgehog qui sont impliquées et qui déterminent le positionnement des cellules. Le gène *wingless* est exprimé dans les cellules situées à l'extrémité postérieure des parasegments et son produit activera l'expression de *engrailed* et de *hedgehog* dans les cellules directement adjacentes localisées dans la région antérieure du parasegment suivant. Le produit Hedgehog activera en retour *wingless* dans les cellules postérieures des parasegments. Les cellules produisant Hedgehog constitueront la limite antérieure des segments définitifs.

11.8 Les gènes Hox forment des complexes à l'intérieur desquels ils sont disposés sur un chromosome selon un ordre précis. Ils sont transcrits de 3' en 5' et leur expres-

sion au niveau du corps s'effectue selon l'axe antéro-postérieur, en coïncidence avec leur disposition sur le chromosome. Ainsi les gènes en 3' sont exprimés dans les régions antérieures de l'embryon cependant que ceux situés vers l'extrémité 5' le sont dans les régions postérieures.

11.9 Chez les Mammifères, on désigne sous le terme de paralogues, des gènes Hox appartenant à des complexes différents portés par des chromosomes différents mais qui sont situés au même niveau dans l'orientation 3'-5' des chromosomes qui les portent. Ces gènes présentent entre eux une forte homologie de séquence en raison de leur origine commune due à un phénomène de duplication.

11.10 La zone à activité polarisante est à l'origine de facteurs responsables de la polarité du membre selon l'axe antéro-postérieur. Située dans la région postérieure d'un bourgeon de membre au niveau de sa jonction avec le restant du corps, cette zone sécrète Sonic hedgehog sous l'influence de FGF8 émis par la crête ectodermique apicale. Sonic hedgehog induit de façon indirecte l'expression de divers facteurs responsables de l'identité des doigts.

Chapitre 12

12.1 La mise en route de l'expression du génome zygotique a lieu lors de la transition blastulécienne qui se manifeste à des périodes variables de la segmentation selon les espèces.

12.2 Le pouvoir de régulation des déficiences totales et/ou partielles s'observent à des degrés divers dans de nombreuses espèces dépourvues de déterminations précoces des territoires. Celles-ci sont dues à la présence de constituants cytoplasmiques qui confèrent aux territoires qui les possèdent une destinée définitive.

12.3 Ce sont essentiellement des signaux extra-cellulaires (facteurs paracrines, contacts intercellulaires) qui sont à l'origine des processus inducteurs conduisant à des déterminations au cours de la vie embryonnaire des Vertébrés. Même si elle existe, la part jouée précocement par des déterminants cytoplasmiques dans le devenir des différenciations cellulaires est réduite.

12.4 La présence de déterminants cytoplasmiques particuliers, ségrégués précocement au cours de la segmentation, peut conditionner la destinée des cellules qui les contiennent. L'embryon est constitué dans ce cas de cellules dont le devenir est défini dès le début du développement. Ces déterminations cellulaires endogènes précoces sont responsables du type d'œufs à développement mosaïque (ex. : Annélides, Mollusques...).

12.5 Des déterminants cytoplasmiques responsables d'une détermination germinale ont été identifiés et partiellement caractérisés chez de nombreuses espèces. On peut citer le cas de leur localisation dans le plasme polaire des ovocytes d'Insectes ou de leur individualisation cytoplasmique sous la forme des granules P dans l'œuf de *C. elegans*.

12.6 L'existence de vrais jumeaux atteste de la réalité du pouvoir de régulation totale des déficiences chez l'homme. Les vrais jumeaux se forment à partir d'un seul

ovule fécondé dans lequel, lors des phases précoces de la segmentation, peut se produire une séparation accidentelle de deux lots cellulaires qui seront à l'origine de deux individus possédant le même patrimoine génétique.

12.7 Chez les Amphibiens, le centre de Nieuwkoop correspond à un ensemble de cellules dorso-végétatives qui émettent des signaux inducteurs à l'origine de la formation du centre de Spemann au niveau de la zone marginale dorsale.

12.8 Chez le xénope, au cours des premiers stades de la segmentation (entre les stades 32 et 128 cellules), des signaux en provenance de l'hémisphère végétatif se manifestent en direction de la zone marginale et ont pour effet une détermination mésodermique de cette région embryonnaire. Ces signaux sont dus à des molécules d'origine maternelle (facteurs protéiques ou transcrits traduits après la fécondation, localisés initialement dans la région végétative de l'ovocyte).

12.9 Les protéines dorsalisantes synthétisées à partir du centre organisateur de Spemann (Noggin, chordin, Frizbee) diffusent selon un gradient décroissant de concentration depuis la région dorsale vers la région ventrale. Ce sont des antagonistes des molécules ventralisant le mésoderme (BMP4 et Wnt8). Une régionalisation du mésoderme se met en place selon l'axe dorso-ventral. Les protéines dorsalisantes à fortes concentrations, en inhibant les facteurs ventralisant BMP4 et Wnt8, spécifient dorsalement le mésoderme, leur absence permet une ventralisation du mésoderme. Pour des concentrations faibles de ces facteurs dorsalisants, une spécification intermédiaire mésodermique est réalisée.

Chapitre 13

13.1 Ce sont des cellules endo-mésodermiques qui sont les premières à s'invaginer lors du déclenchement des mouvements morphogénétiques d'invagination (ou embolie) de la gastrulation chez les Amphibiens. La morphologie de ces cellules est due à la dynamique de leur architecture cytosquelettique.

13.2 Les deux principales familles de molécules impliquées dans l'adhérence intercellulaire sont celles des cadhérines et des immunoglobulines.

13.3 De par leurs propriétés contractiles, les microfilaments d'actine jouent un rôle majeur dans la dynamique de la morphologie cellulaire. Le système microtubulaire intervient quant à lui dans la stabilisation des structures morphofonctionnelles de la cellule.

13.4 Ce sont essentiellement des intégrines. La nature des sous-unités qui les composent détermine des spécificités de liaisons plus ou moins larges à divers constituants matriciels protéiques et notamment à ceux qui comportent une séquence RGD. Le système éphrine/Eph intervient également en déterminant les voies de migration par des jeux d'attraction/répulsion entre cellules voisines.

13.5 Ce sont les connexons, assemblages de 6 connexines, qui forment des hémicanaux. Les canaux fonctionnels constituant les jonctions communicantes entre cellules contiguës résultent de la mise en continuité des connexons appartenant à chacune de ces cellules.

13.6 Les « gap junctions », peuvent réguler une coordination fonctionnelle intercellulaire, en permettant ou non la transmission d'un signal reçu par un nombre restreint de cellules cibles à travers une plage cellulaire élargie, via le passage entre cellules de seconds messagers.

13.7 Une désorganisation partielle d'une structure épithéliale stable, constituée par des cellules jointives, peut se manifester par suite de ruptures des jonctions intercellulaires. Les cellules qui se détachent, une fois isolées, peuvent acquérir une mobilité et migrer, leur conférant un statut de cellules mésenchymateuses. Ce processus de transition s'observe au cours du développement (ex. : isolement des cellules des crêtes neurales associé à la fermeture de la gouttière neurale chez les Vertébrés, formation des cellules du mésenchyme primaire lors de la gastrulation chez les oursins). Il est directement impliqué dans la formation de cellules tumorales à l'origine de métastases.

13.8 A l'inverse de la transition épithélio-mésenchymateuse, des structures épithéliales peuvent s'édifier à partir de cellules d'un tissu mésenchymateux. C'est notamment le cas lors de la formation des tubules rénaux à partir des blastèmes néphrétiques ou bien encore quand à partir des bandelettes mésodermiques mésenchymateuses présomitiques s'effectue l'individualisation des somites qui s'accompagne d'un processus d'épithélialisation.

13.9 La contraction d'éléments cytosquelettiques microfilamentaires d'actine présents à l'un des pôles, basal ou apical, des cellules d'un épithélium entraîne un plissement des domaines membranaires de ces régions semblable à celui provoqué sur le pourtour d'une bourse quand on tire sur ses cordons. Ceci conduit, en raison de l'existence des complexes jonctionnels reliant ces cellules entre elles, à un changement de conformation du territoire cellulaire concerné se traduisant par un creusement ou un bombement. (ex. : formation de la gouttière neurale).

13.10 Des protéases produites par des cellules du stroma sur lequel repose une structure épithéliale peuvent dégrader, de façon spécifique ou non, les constituants de la lame basale (ex. : plasmine, MMPs). De même des osidases peuvent participer à la déstructuration de la basale en digérant les chaînes glycosylées des GAGs et protéoglycannes.

Chapitre 14

14.1 La nécrose correspond à une mort cellulaire généralement accidentelle qui s'accompagne par l'éclatement de la cellule lésée avec pour conséquence l'apparition d'une réaction inflammatoire locale. Cette mortalité cellulaire est à distinguer de l'apoptose due à une programmation se traduisant par une déstructuration de la cellule sans son éclatement suivie de sa phagocytose par des macrophages, ce qui n'entraîne pas de réaction inflammatoire.

14.2 Des molécules telles que TNF α ou FasL, en se fixant spécifiquement à des récepteurs à domaine de mort, provoquent la transduction d'un signal d'apoptose selon une voie dite extrinsèque.

14.3 Sous l'action de stimuli dits apoptogènes, des molécules cytosoliques (Bax, Bad, Bak) peuvent s'insérer dans les membranes mitochondriales et inactiver les molécules anti-apoptotiques Bcl, ce qui provoque l'ouverture de pores libérant dans le cytoplasme le cytochrome c mitochondrial. Ceci formera la première étape d'une suite de réactions aboutissant au déclenchement des processus protéolytiques.

14.4 Il correspond à un complexe cytoplasmique impliqué dans la voie dite intrinsèque de l'apoptose. Il comporte le cytochrome c libéré par l'ouverture de pores membranaires mitochondriaux et le facteur Apaf-1. C'est à son niveau que s'associent et sont activées des molécules de pro-caspase 9 qui se transforment en caspases 9 initiateurs actives capables d'activer la pro-caspase 3 en caspase 3 effectrice possédant une puissante activité protéolytique.

14.5 Les caspases initiateurs activent des caspases effectrices, ces dernières étant responsables des dégradations protéolytiques.

14.6 L'individualisation du cubitus et du radius au niveau de l'avant-bras ainsi que celle des doigts avec la disparition des structures membranaires interdigitales sont dues à des apoptoses.

14.7 L'absence de processus apoptotiques lors de la neurogenèse provoque une létalité embryonnaire due à un surcroît cellulaire qui provoque une déformation générale de l'encéphale et l'oblitération des cavités cérébrales. De plus, au niveau du système nerveux périphérique, l'innervation de certains organes s'avère perturbée (ex. : l'innervation musculaire).

14.8 La disparition des signaux engendrés par les liaisons établies entre molécules membranaires des cellules épithéliales et divers constituants matriciels de la lame basale sur laquelle repose l'épithélium aboutit généralement au déclenchement d'événements apoptotiques conduisant à la dégradation de la structure épithéliale.

14.9 Certaines disparitions de structures larvaires lors du phénomène de la métamorphose sont causées par apoptose. C'est le cas par exemple d'événements dégénératifs conduisant à la disparition de la queue et des branchies chez les larves d'Anoures.

Chapitre 15

15.1 La spécification correspond à l'engagement cellulaire dans une voie de différenciation qui est encore réversible et sensible à des influences environnementales. La détermination est une phase finale irréversible qui conduira les cellules dans un processus terminal de différenciation.

15.2 Dans les conditions normales du développement, la zone de laèvre dorsale du blastopore est à l'origine de territoires cellulaires se différenciant en endoderme pharyngien, en matériel cordal et somitique. Dans l'expérience de Spemann et Mangold, le matériel greffé donne naissance, par autodifférenciation dans l'embryon surnuméraire, aux mêmes tissus que ceux qui sont formés dans les conditions normales. Ceci signifie que les cellules de laèvre dorsale du blastopore sont déterminées.

15.3 L'expérience d'exogastrulation montre qu'un contact entre ectoderme et matériel cordal est nécessaire pour qu'une différenciation nerveuse se réalise à partir

de l'ectoderme. De plus, elle révèle le pouvoir d'auto-organisation et d'autodifférenciation de l'endomésoderme attestant par là-même son état déterminé.

15.4 Le centre organisateur de Spemann, laèvre dorsale du blastopore, le mésoderme précordial et cordal.

15.5 La compétence d'un tissu est l'état dans lequel il se trouve et qui le rend apte à recevoir et à répondre à des signaux inducteurs.

15.6 L'ectoderme à partir duquel se différencie le neuroderme est spécifié pour ce dernier mais reçoit des signaux inducteurs épidermisant. C'est l'inhibition des facteurs responsables de l'induction épidermique, des BMPs notamment, par des molécules antagonistes (chordin et Noggin pour les BMPs) qui permet aux cellules ectodermiques leur différenciation en cellules nerveuses.

15.7 Ce sont : la voie impliquant MAPK/ERK activée par le FGF8 dont le gradient décroissant entraîne progressivement l'inactivation de cette voie, ce qui initie le processus d'individualisation des somites ; le système Delta/Notch et la voie Wnt activant respectivement les gènes cycliques *Lfng* et *hairy* d'une part, et *axin2*, d'autre part ; le système de signalisation éphrine/Eph qui intervient lors de la fragmentation du matériel présomitique en somites.

15.8 Si la mise en place d'un plan de symétrie bilatérale est précoce chez l'ensemble des espèces (dès la fécondation chez les Amphibiens), en revanche la disposition asymétrique finale de certains organes est soumise à des facteurs s'exprimant plus tardivement, généralement lors de la gastrulation.

15.9 Les cellules ventrales de la région du nœud sont ciliées. Le battement ciliaire crée un mouvement vectoriel du liquide extra-cellulaire désigné sous le terme de flux nodal. Il est dirigé vers la gauche, au niveau du mésoderme latéral de l'embryon, et il est considéré comme distribuant de manière asymétrique des facteurs responsables de l'asymétrie droite/gauche.

15.10 Induction par le mésoderme précordial des vésicules optiques à partir du diencéphale ; induction par les vésicules optiques des placodes cristalliniennes à partir de l'épiderme ; induction par les vésicules cristalliniennes des feuilletts rétiniens à partir des vésicules optiques ; induction de la cornée par le cristallin à partir de l'épiderme.

15.11 Un champ morphogénétique correspond à un territoire dont le devenir des cellules qui le composent est déterminé.

Chapitre 16

16.1 Globalement, les produits synthétisés durant la vie embryonnaire sont sensiblement identiques à ceux initialement présents dans l'ovocyte. Ils sont constitués en grande partie par des molécules dites de ménage, c'est-à-dire indispensables au fonctionnement cellulaire.

16.2 Ce sont généralement des molécules qui interviennent dans les processus liés à la mise en place des déterminations cellulaires et des molécules tissu-spécifiques qui apparaissent lors des différenciations cellulaires.

16.3 À partir de la transition blastuléenne qui se manifeste vers les 10-12^{ème} cycles de la segmentation.

16.4 Les premières expériences de transplantation de noyaux provenant de cellules somatiques adultes dans des œufs d'Amphibiens ont permis de montrer que ces noyaux ont conservé un certain niveau de pluripotence, que l'activité des gènes est sous le contrôle de facteurs cytoplasmiques, et qu'un nouvel environnement cytoplasmique permet de modifier profondément l'expression du génome contenu dans le noyau greffé.

16.5 Chez tous les Mammifères placentaires, il existe pour certains gènes une répression programmée d'un des allèles selon le sexe parental. Seule la diploïdie résultant d'une fécondation permet de compenser la présence de l'allèle silencieux provenant de l'un des parents par l'apport de l'allèle qui s'exprime, issu de l'autre parent. L'existence de gènes soumis à ce qui est désigné sous le terme d'empreinte parentale exclut toute possibilité de parthénogenèse.

16.6 Avec l'obtention de la brebis Dolly, il a été démontré qu'il était possible de cloner des organismes à partir de greffes de noyaux issus de cellules somatiques différenciées et considérées comme ayant perdu leur totipotentialité d'expression génomique. En présence de facteurs cytoplasmiques ovocytaires et sous certaines conditions expérimentales, il est ainsi apparu qu'une reprogrammation du génome assurant une totipotentialité était possible.

16.7 Ce sont des cellules souches issues de la masse cellulaire interne de blastocyste de Mammifères qui, sous certaines conditions de culture, sont capables de se renouveler indéfiniment et, en présence de facteurs appropriés, de se différencier en la plupart des types cellulaires de l'organisme. Pour cette dernière raison, elles sont qualifiées de pluripotentes.

16.8 Non, seules les cellules capables de donner un organisme complet sont qualifiées de totipotentes, ce qui n'est pas le cas des cellules ES. La cellule-œuf répond à cette définition, de même que chez certaines espèces où s'exprime un pouvoir de régulation totale des déficiences, des blastomères isolés à des stades plus ou moins précoces de la segmentation.

16.9 Ce sont des cellules engagées dans une voie de différenciation spécifique mais qui peuvent être, néanmoins, à l'origine d'un nombre restreint de types cellulaires différents (exemple des cellules souches hématopoïétiques).

16.10 Ce sont les gènes *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* et plus récemment *Ronin* qui ont été reconnus comme jouant un rôle régulateur essentiel pour le maintien du caractère pluripotent des cellules ES.

Chapitre 17

17.1 C'est au niveau de la somatopleure, en position dorsale, que se creusent les crêtes génitales qui sont colonisées par des gonocytes primordiaux. Selon des modalités différentes en fonction des espèces, le blastème mésonéphrétique participe par un envahissement mésenchymateux des crêtes génitales à la formation des gonades.

17.2 Ce sont généralement des cellules de grande taille, riches en inclusions cytoplasmiques dans lesquelles sont contenus notamment des déterminants spécifiques présents initialement dans le plasme polaire, quand il existe, de la cellule-œuf. Ces cellules ont une grande capacité migratrice, leur site de différenciation étant le plus souvent éloigné des crêtes génitales qu'elles colonisent.

17.3 Selon les espèces, les cellules germinales primordiales apparaissent dans des territoires embryonnaires différents (endoderme ventral chez les Amphibiens Anoures, cellules épiblastiques colonisant le croissant germinatif extra-embryonnaire situé dans la partie antérieure de l'aire pellucide chez les Oiseaux).

17.4 C'est un stade précoce de la gonadogenèse qui est transitoire et qui se caractérise par une structure gonadique identique dans les deux sexes.

17.5 Les canaux de Wolff chez les Vertébrés anamniotes mâles évoluent en urospermiductes et assurent l'évacuation des produits génitaux et urinaires. Ils persistent chez les femelles en tant qu'uretères. Chez les Vertébrés amniotes, la mise en place d'uretères secondaires dévolus à la seule fonction urinaire entraîne la disparition des canaux de Wolff chez les femelles, et leur maintien pour la seule évacuation des produits génitaux chez les mâles. Dans ce dernier cas, ils deviennent les canaux déférents.

17.6 C'est l'hormone anti-mullérienne (AMH) produites par les cellules de Sertoli.

17.7 Durant la spermatogenèse chez le père suite à une translocation entre des chromosomes X et Y, le chromosome X peut se trouver porteur du gène *SRY*. Quoiqu'ayant une formule chromosomique 46XX, l'enfant porteur du chromosome X transloqué présentera alors un phénotype mâle en raison de la présence du gène de masculinisation *SRY*.

17.8 Le gène *SRY* est indispensable à la masculinisation d'un individu. Cependant, d'autres gènes sont nécessaires pour que des gonades mâles se différencient et fonctionnent normalement. C'est le cas des gènes autosomaux s'exprimant dans les cellules somatiques testiculaires *SOX9* (cellules de Sertoli) et *SFI* (cellules de Leydig) à divers temps de la gonadogenèse mâle.

17.9 Dans la majorité des Vertébrés, le sexe est déterminé génétiquement. Cependant chez de nombreuses espèces ectothermes, la différenciation sexuelle est conditionnée par des facteurs environnementaux qui agissent durant des périodes critiques du développement embryonnaire ou larvaire. L'un des facteurs les mieux connus est la température qui détermine chez les Reptiles (en particulier chez les Crocodiliens et chez de nombreux Chéloniens), les pourcentages de mâles et de femelles. D'autres facteurs se sont révélés capables de déterminer l'expression sexuelle tel l'effet social observé chez le poisson-clown. Le sexe génétique n'est pas modifié.

17.10 Établissement d'un sexe génétique dû à la formule hétérochromosomique de l'individu; mise en place d'un sexe gonadique sous contrôle génétique; expression d'un phénotype sexuel sous une dépendance hormonale d'origine gonadique.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTS (B.), BRAY (D.), LEWIS (J.), RAFF (M.), ROBERTS (K.) et WATSON (J.D.), 1995. – *Biologie moléculaire de la cellule*. (4^e édition 2004), Médecine Sciences, Flammarion, Paris.
- BALLY-CUIF (L.), 1995. – *Les gènes du développement*. Collection « Masson Sciences », Dunod, Paris.
- BEAUMONT (A.), HOURDRY (J.), VERNIER (J.M.), et WEGNEZ (M.), 1994. – *Développement*. Dunod, Paris.
- CATALA (M.), 2003. – *Embryologie. Développement précoce chez l'humain*. Collection « Abrégés », Masson, Paris.
- CHANOINE (C.), 2007. – *Bases cellulaires et moléculaires du développement*. Ellipses, Paris.
- COLLENOT (A.) et SIGNORET (J.), 2000. – *L'organisme en développement. La construction de l'adulte*. Hermann, Paris.
- DARRIBÈRE (T.), 2002. – *Introduction à la biologie du développement*. Collection Sup, Belin, Paris.
- DARRIBÈRE (T.), 2003. – *Le développement d'un mammifère : la souris*. Collection Sup, Belin, Paris.
- DAVID (G.) et HAEGEL (P.), 1991. – *Embryogenèse. Étapes initiales du développement - Annexes - Placenta*. (4^e édition). Masson, Paris.
- DAVIDSON (E.H.), 1986. – *Gene activity in early development*. (3^e édition). Academic Press, New York-London.
- DEVOS (L.) et VAN GANSEN (P.), 1980. – *Atlas d'embryologie des Vertébrés*. Masson, Paris.
- FOUCRIER (J.) et BASSEZ (G.), 2008. – *Embryologie humaine*. EdisScience, Paris.
- FRANQUINET (R.) et FOUCRIER (J.), 2003. – *Atlas d'embryologie descriptive* (2^e édition), Collection « Sciences Sup », Dunod, Paris.
- GERHART (J.) and KIRSCHNER (M.), 1997. – *Cells, embryos and evolution*. Blackwell Science, Oxford.
- GEHRING (W.), 1999. – *Biologie et Physiologie animales*. De Boeck Université, Bruxelles.
- GILBERT (S.F.), 2003. – *Biologie du développement*. (Traduction de la 7^e éd. 1994) De Boeck Université, Bruxelles.
- GILBERT (S.F.), 2006. – *Developmental Biology*. (8^e édition). Sinauer Associates Publisher, Sunderland.
- HOLSTEIN (A.F.) et ROOSEN-RUNGE (B.C.), 1981. – *Atlas of human spermatogenesis*. Springer Verlag, Berlin.

Biologie du développement

- LANGMAN (J.) et SADLER (T.W.), 1996. – *Embryologie médicale* (6^e édition). Pradel, Paris.
- LE DOUARIN (N.), 2000. – *Des Chimères, des clones et des gènes*. Sciences, Éditions Odile Jacob, Paris.
- LENDER (T.), DELAVAUULT (R.), et LE MOIGNE (A.), 1994. – *Dictionnaire de Biologie*, (2^e édition), Presses Universitaires de France, Paris.
- POIRIER (J.), CATALA (M.), COHEN (I.) POIRIER (J.) et BAUDET (J.), 2005. – *Leçons d'Embryologie humaine*. Maloine, Paris.
- POURQUIE (O.), 2002. – *Biologie du développement*. Collection Méthodes, Hermann, Paris.
- SADLER (T.W.) 2005. – *Atlas d'embryologie médicale de Langman* Pradel, Paris.
- SIGNORET (J.), et COLLENOT (A.), 1991. – *L'organisme en développement. Des gamètes à l'embryon*. Hermann, Paris.
- SLACK (J.), 2004. – *Biologie du développement* (Traduction de la 1^{re} édition anglaise, 2001). De Boeck, Bruxelles.
- THIBAUT (C.), BEAUMONT (A.) et LEVASSEUR (M.-C.), 1998. – *La reproduction des Vertébrés*. Collection « Enseignement des Sciences de la vie », Masson, Paris.
- WOLPERT (L.), 2004. – *Biologie du développement. Les grands principes*. (Traduction de l'édition anglaise, 1998). Dunod, Paris.

Ouvrages collectifs

- 1985 – *Early Amphibian Development*. Slack (J.), J. Embryol. Exp. Morph., 85 suppl., Cambridge.
- 1986 – *Determinative mechanisms in early development*. Wylie (C.C.), J. Embryol. Exp. Morph., 97 suppl., Cambridge.
- 1986 – *The Cell in contact*. Edelman (G.M.) et Thiéry (J.-P.), John Wiley and son, New York.
- 1998 – *Biologie du développement. Morphogenèse animale. Unité et diversité des Métazoaires*. Hourdry (J.), Ellipses, Paris.
- 2001 – *La reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. Thibault (C.) et Levasseur (M.-C.), éditions de l'INRA Ellipses, Paris.

Revue

- BioEssays, revue mensuelle, Wiley, New York.
- La Recherche, revue mensuelle, Paris.
- Médecine-Sciences, revue mensuelle, Paris.
- Pour la Science, revue mensuelle, Paris.

INDEX

Les références relatives aux protéines ont été portées dans le corps de l'index cependant que celles des gènes, mentionnées en italique, ont été regroupées dans la rubrique « gènes ». Il est donc conseillé, lors de la recherche d'une protéine et/ou d'un gène donné, de consulter à la fois l'item « gènes » et la rubrique alphabétique appropriée à laquelle appartient le terme recherché.

A

- α -actinine, 253,258
- α -amanitine, 222
- ABP, 30
- Acide rétinoïque, 166, 188, 194, 195, 268, 295, 308-310
- Acron 68, 113
- Acrosine, 19,78
- Acrosome, 17, 19 -24,75
- Acrotrophique (ovariole), 63
- Actine (voir aussi microfilaments)
 - cardiaque, 237
 - musculaire, 292, 331, 333
- Actinomycine D 91, 221, 222, 241, 321
- Activateur du plasminogène, 46
- Activation de l'œuf, 81, 94
- Activine (s), 13, 27, 30, 39, 44, 168, 229, 231, 234-236, 240, 241, 287, 289, 292, 293, 307, 317
 - Activine A 168, 236
 - Activine B 236, 307
- ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease proteins*) 80
- Adhérence
 - cellulaire, 247, 248, 263, 264
 - des gamètes, 75 et suiv.
- ADN
 - méthylation, 339
 - mitochondriaux, 340
 - polymérase, 54, 90
 - sondes (ADNc), 328
 - synthèses 7, 205, 317
- Aire
 - opaque, 133, 136
 - pellucide, 35, 69, 76-78, 133, 136, 147
- Albuginée, 10, 335
- Albumine, 131, 145
- Alécithe (voir Œuf)
- Allanto-chorion, 145, 157
- Allantoïde, 143-145,152-156
- AMH (voir Hormones)
- Amnio-chorion, 157
- Amniogenèse
 - par cavitation, 153
 - par plissement , 153
- Amnios, 143, 144, 150, 153
- Amnio-séreuse, 110
- Amphiaster, 89
- Amphimixie, 73, 85, 87, 89
- Amplification
 - d'une séquence génique, 183
 - des organisateurs nucléolaires, 51, 58
- Anaphase, 8
- Androgènes (voir Hormones)
- Androgénétique (embryon), 334
- Aniridie, 314
- Annexes embryonnaires, 103, 142 à 146, 155
- Annulus, 18,21
- Anophtalme, 312
- Antagonistes de facteurs de croissance, 172
- Antennapedia (Voir complexe) 181
- Antrum, 39
- Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*) 267,
- APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) 232
- Apoptose 198, 266 à 270, 285, 351
- Apoptosome 267
- Archentéron 102, 107, 118, 123, 143, 279

Index

- ARN (acide ribonucléique)
40S 53
antisens 168
de transfert (ARN-t), 240
maternel 240
natif 48
non codant 376
non fonctionnels 54
nucléaires 240
nucléolaires 51 à 53
synthèses 15, 48, 57, 62, 239-240, 318, 327
polymérase 48, 50
pré-messagers 50, 240
ribosomiques (ARN-r) 51, 55, 58, 240
- ARN-m (messagers) 91
de la blastula 325
de la gastrula 325, 326
de l'ovocyte 221, 325, 326
maternels 220 à 223, 241, 325, 326
maternels (traduction des), 223
neutralisation des, 55
poly-A 50, 207, 220 à 223, 240, 328
sélection 223
stables 54, 58
tardifs 327
- Aromatase 44, 361
Asymétrie droite-gauche 172, 305 à 307
Atrésie folliculeuse 33, 37, 39, 45
Autodifférenciation 215
Autosomes 359
Auxocytes 4, 5
Axe
animal-végétatif 69, 219
antéro-postérieur 174, 219, 294
céphalo-caudal 64, 216
dorso-ventral 64
Axonème 18, 19, 21
- B**
- Bandelette germinative, 110
Barrière
hémato-testiculaire, 12, 355
placentaire, 159
β-caténine, 164, 165, 171, 209, 213, 228, 231-236, 241, 297, 335
Bcl-2, 267, 268
Bicoïd, 68, 174 à 176
Bindine, 75, 79, 87
Bithorax (voir complexe)
Bivalent (chromosome,) 7
Blastème
gonadique, 346, 352
mésonephritique, 352, 357 - 359
Blastocèle, 105, 106, 117, 245, 261
primaire, 133
secondaire, 135
Blastocyste, 216
primaire, 133, 148
secondaire, 149
Blastoderme, 102, 108, 133, 176, 180
Blastodisque, 103, 132, 216
Blastomères, 99, 133, 204, 217
végétatifs, 225 - 228, 234, 236
Blastopore (voir aussi fente et lèvres blastoporales)
102, 107, 118, 123, 244, 246
Blastula, 99, 148, 149, 204, 225, 242,
avec mésenchyme, 106
secondaire, 134
BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), 172, 198, 269, 270, 290, 293 - 295, 300
BMP2, 198, 200, 238, 269, 292, 299
BMP4, 213, 236 - 238, 242, 262, 263, 268, 269, 289, 292, 293, 296, 298 - 300, 307, 313, 331, 343
BMP5, 296
BMP7, 198, 238, 269, 296
Boîte HMG (*High-Mobility Group*), 165, 363, 366,
Bouchon vitellin, 118
Bourgeon de membre, 320 (voir aussi membres des Vertébrés)
Bourrelets médullaires, 125
Bouton embryonnaire (voir Masse cellulaire interne)
Brachyury, 242
- C**
- Cactus 64, 67, 68, 176
Cadhérines (voir aussi N-cadhérines), 250 - 252, 254
Caduque, 159
Calmoduline, 61, 84

- Calotte
 animale 226, 242
 végétative 226
- CAM (*Cell Adhesion Molecule*), 248, 251, 253, 254, 264
- Canal
 cordal, 151
 de Müller, 358, 359, 366, 373
 de Wolff, 10, 22, 23, 357-359, 373
 déférent, 10, 359
 efférent(s), 10, 358, 239
- Capacitation, 23, 24, 75, 78
- Capacité de régulation, 211
- Carcinomes, 255
- Caronte, 307
- Carte des territoires présomptifs, 120, 136, 137
- Caryopathies, 336
- Caspases (*Cysteinic-aspartase-specific-proteinases*), 267, 268, 270
- Caténines, 252
- Cavité
 amniotique, 143, 144, 153
 proamniotique, 270
 séro-amniotique, 144
- CD9, 79
- CED-3, -4, -9, 267
- Cellules compétentes, 224
 de la lignée spermatique, 11
 de la thèque (voir thèque)
 de Leydig, 10, 13, 28 - 30, 130, 355, 365 - 367, 369
 de Sertoli, 11, 12, 16, 28 - 30, 353, 364 - 367, 370, 374
 des crêtes neurales, 254, 262
 folliculeuses (voir aussi *granulosa*), 32, 356, 357, 367
 germinales, 13
 germinales primordiales, 32, 70, 108, 138, 207, 334, 346- 349, 366
 lactotropes, 45
 lutéales /lutéïniques, 39
- MAPC (*Multipotent Adult Progenitor Cell*), 344
- myoïdes, 12, 30
- neuroblastiques, 110
- nourricières, 62, 63, 176
- polaires, 108, 110, 351
- trophoblastiques, 47
- Cellules souches, 343
 embryonnaires (E S : *Embryonic Stem cells*), 217, 332, 341
 multi-, pluri-, totipotentes, 341
 pluripotentes induites (ou cellules iPS), 344
- Centre de Nieuwkoop, 228, 234-236, 241, 277, 286
- Centre organisateur de Spemann et Mangold, 229, 235, 236, 241, 273 à 277, 279, 282, 286, 290, 294
- Centriole, 88, 89
 distal, proximal, 20
- Centrolécithe (voir Œufs)
- Centrosome, 94
- Cerberus, 164 172, 235, 296, 299,
- Cerveau postérieur, 193
- Chalazes, 132
- Champs morphogénétiques, 318, 319
- Chiasma, 8, 34, 48
- Chimère(s), 85, 215, 217, 218, 344, 364, 366, 367
- Chimiotaxie, 74, 350
- Chondroïtine sulfate, 263
- Chordin, 172, 290, 292, 294, 296, 298, 299
- Chorion, 108, 144, 150, 155, 157
- Choroïde, 310
- Chromatides, 48
- Chromomères, 48
- Chromosomes
 en écouvillon (ou Lampbrush), 8, 48, 53
 sexuels, X et Y, 359, 360, 362
 (voir aussi méiose)
- Cicatricule, 131
- Clonage,
 clonage reproductif, 337 et suiv
 thérapeutique, 337, 340
- Coelome, 126, 152
 extra-embryonnaire, 144, 153
- Coiffe post-acrosomique, 79, 80
- Colchicine, 246
- Colinéarité (voir Règle de)
- Collagène, 256, 258, 263, 321

Index

- Communications intercellulaires, 255
et suiv.
- Compaction, 149, 253
- Compensation de dose, 376
- Compétence, 193, 273, 280, 281, 312
- Complexe(s)
- Antennapedia 182, 188
 - Bithorax 182, 188
 - de transcription, 164
 - HOM 182
 - Hox 182, 187
 - hypothalamo-hypophysaire, 26
 - synaptonémaux, 7, 34
- Concanavaline A, 78, 350
- Conduits génitaux (mâles, femelles, urinaires), 357, 358
- Cône de fécondation, 80
- Connexines, Connexon, 255, 285
- Contactine, 250
- Convergence, 122, 138
- Corde, 126, 128, 138, 151, 278, 279, 293, 296, 307
- Cordons
- sexuels, 356
 - sexuels primaires, 351
 - testiculaires, 352, 353, 355
- Cornée transparente, 310, 311, 314, 316
- Corona radiata, 20, 37, 39, 69, 75, 147
- Corps
- apoptiques, 266
 - gras, 63
 - jaune (ou progestatif), 39, 46, 47
 - résiduel, 16, 19
 - vitellin de Balbiani, 34, 69, 147
- Corpus albicans, 39, 47
- Corpuscule de Barr, 359, 376
- Cortex, 69, 81, 116, 147, 351, 356
- Co-ségrégation des brins matrice, 343
- Couche hyaline, 85
- Crête(s)
- ectodermique apicale, 197, 200
 - génitales, 346 à 348, 350, 368
 - neurales (voir aussi cellules neurales), 125, 127, 128, 191, 192, 263, 300
- Cristallin, 286, 310, 313, 316
- Cristallines, 313, 320
- Croissant
- dépigmenté, 90, 116
 - germinal, 138, 350
 - gris, 116, 118, 206, 206, 213, 215, 279
 - jaune, 209
- Crossing-over, 8
- Cryptorchidie, 25
- CSF (*Cytostatic factor*), 54, 60-62
- Cubitus interruptus, 172
- Cumulus oophorus, 39, 46
- Cupule optique, rétinienne, 313
- Cycle(s)
- cellulaire, 205
 - menstruel, 41
 - œstrien, 41, 372
 - ovarien, 41, 372
 - ovogénétique, 4
 - spermatogénétique, 4, 14
- Cycline, 90, 92
- cycline B, 60, 61
- Cyclope, 312
- Cyste
- testiculaire, 355
 - ectochorial, 153
- Cytochalasine B, 210, 247
- Cytochrome P450, 44
- Cytogénétique, 361
- Cytokératine, 299
- Cytokine (interleukine), 13
- Cytoplasme cortical, 114, 228
- Cytosquelette, 56, 66, 207, 244, 247, 301
- Cytotrophoblaste, 153
- ## D
- Decapentaplegic (Dpp) 169, 298
- Décharge gonadotrope ovulante, 45
- Décidue, 159
- Délétions, 8
- Delta, 173, 301, 284
- Delta-Notch, 173, 284
- Déprogrammation du noyau, 339
- Dermatome, 128
- Dermomyotome, 128, 331
- Derrière, 169
- Desmocolline, 252
- Desmogléine, 252

- Desmoplakine, 252
- Déterminant(s)
cytoplasmiques, 55, 69, 207, 210, 212, 348
germinal, 207
sexuel, 362
- Détermination, 204, 215, 216, 274, 327
- Développement en mosaïque, 207, 209, 242
- Dextogyre (enroulement), 70
- Diacinèse, 8, 39
- Diacylglycerol (DAG), 83, 84
- Diapédèse, 350
- Dickkopf, 172, 295, 297
- Dictyotène, 8, 34
- Différenciation
des gonades 346 et suiv
du testicule, 366
de l'ovaire, 298
neurale, 298
- Dihydrotestostérone, 372
- Diploblastique, 102
- Diplotène, 8, 34, 48
- Discoblastula, 102
- Dishevelled, 171, 232, 241
- Disque(s)
germinatif, 131, 132
imaginaux, 186
- Divergence, 123, 138
- Divisions asymétriques (cellules souches)
343
- Doigts (formation des) 199, 200, 269
- Dolly, 338
- Domaine de mort (DD *Death Domain*), 269
- Dorsal, 64, 68, 176, 335
- Dorsalisation
de l'embryon d'Amphibien, 231 et suiv.
d'insecte 66-68, 176, 177
- DSS (*Dosage Sensitive Sex reversal*), 368
- Duplication (méiose), 8
- Dynéine, 19, 22, 74
- E**
- E-cadhérine 253 à 255
- Ectoderme 102, 107, 110, 120, 215, 246, 274, 281
dorsal 277, 299
extra-embryonnaire 136
- Ectophylle (voir épiblaste)
- Effets maternels 65, 70
- EGF (*Epithelial growth factor*), 30
- EGL-1, 267
- Elongation, 122, 138
- Embolie (voir gastrulation)
- Empreinte génomique (ou parentale,) 333
- Endoderme, 102, 107, 121, 129, 136, 138, 152, 216, 229, 244
dorso-végétatif, 225
extra-embryonnaire, 144
pharyngien, 279, 288
polarisé, 228
- Endomètre, 47
- Endothélio-chorial (voir placenta)
- Énergide, 108, 176
- Entactine (ou nidogène), 256, 258
- Entérocoelie, 107
- Entoblaste, 149, 150
- Entophylle (voir hypoblaste)
- Énucléation de l'œuf, 221, 222
- Enveloppe(s)
de l'œuf, (primaire, secondaires), 69
vitelline, 85
- Éphrines (Eph), 173, 284, 304
- Épiblaste, 134, 135, 150
- Épibolie 120, 245
- Épiderme 120, 126, 138, 296 et suiv
dorsal, ventral, 177
- Épididyme, 10, 19, 20, 22, 23, 359
- Épineuriens 298
- Épissage alternatif, 50, 186
- Épithélio-chorial (voir placenta)
- Épithélium germinatif, 349
- Équilibration (voir rotation)
- ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*), 171, 305
- Espace périvitellin, 84, 87
- État pluripotent, 341
- Exogastrulation, 277
- Extension convergente, 122, 123
- F**
- Facteur(s)
cytostatique (voir CSF)
de croissance, 13, 37, 171, 266, 283
de croissance fibroblastique (voir FGF)

Index

- de transcription, 164, 229, 286
- paracrines, 13, 166
- promoteur de maturation (voir MPF)
- TCF, Tcf3, 165, 235
- TDF (*Testicular Determining Factor*), 362
- Fas (récepteur), 269
- Fécondation, 73 et suiv. 206 et suiv
- Fente blastoporale (voir blastopore), 119
- Fertiline(s), 79
- FGF (*Fibroblast Growth Factor*), 171, 222, 224, 237, 242, 253, 297
 - FGF4, 197, 200
 - Fgf7, 350
 - FGF8, 197, 198
 - Fgf8, 304, 305, 307 – 309, 313
 - FGF10, 197
 - FGF β , 289
- Fibronectine, 245, 256 à 261, 263, 349
- Flux
 - ioniques, 81, 82
 - nodal, 308
- Fœtus castrés, 373
- Follicule(s)
 - de De Graaf, 39
 - ovariens, 32 à 40
 - primaires, 37
 - primordiaux, 37, 357
 - secondaires, 37
 - tertiaires (ou cavitaires,) 38
- Follistatine, 172, 240, 287, 290, 293, 294, 296, 299
- FoxD3, 300
- Free-martins, 370, 374
- Frizbee (Frzb), 171, 241, 289
- Frizzled (Xfr7) 170 – 172, 232
- Front de détermination, 304
- FSH (*Follicle Stimulating Hormone*), 27, 29, 42 à 46
- Fushi-tarazu, 180, 184, 185, 186
- G**
- Gamètes, gamétogénèse, 3 à 72
- Ganglions ceérebroïdes, 110
- Gap junctions* (voir jonctions)
- Gastrula, 214, 327, 328, 330
- Gastrulation, 102, 106, 109, 118 à 123, 133 - 139, 150 - 153, 188, 193, 214, 245, 261, 273, 274, 286, 290, 326 - 328, 330,
 - par délamination, 103
 - par épibolie, 102, 120, 245
 - par immigration, 103
 - par invagination (ou embolie), 102, 120, 122
 - par prolifération polaire, 103
- GDNF (*Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor*), 15, 30
- Gémellarité, 217
- Gène(s)
 - à homéodomaine (voir homéodomaine)
 - abdominal B (Abd-B)*, 184
 - Antennapedia (Antp)*, 181 et suiv.
 - antérieurs, 191
 - apaf1*, 270
 - armadillo (arm)*, 177
 - autosomique *SF1 (Steroidogenic Factor 1)*, 365
 - autosomique *SOX9*, 365
 - autosomiques *B-4, C-4, D4*, 188
 - Axin2*, 303
 - Bcl-2*, 267
 - bicoïd*, 64 – 66, 70, 165, 174, 187, 200, 207
 - Brachyury (gènes Tbx)* voir aussi *Xbra*, 200, 235 – 237, 289, 305
 - Buttonhead (btd)*, 177
 - chimères, 184
 - cactus*, 176, 177
 - caronte*, 307, 308
 - caudal*, 64, 65, 175, 176
 - Cdx*, 295
 - ced-3, -4, -9*, 267
 - cerberus, 164, 169, 241, 287, 294, 307
 - chimères, 184
 - chordin, 241, 287
 - c-Myc 344
 - cornichon* 68
 - DAXI* 352, 367, 368
 - Decapentaplegic (Dpp)*, 169, 176, 298
 - Deformed (Dfd)*, 183, 184, 188, 190
 - de dorsalisation, 176
 - de masculinisation, 360
 - de polarité, 174 – 176, 178, 197

- de polarité segmentaire, 172, 177, 180
Derrière, 229, 231
 de segmentation, 177 et suiv.
 de ventralisation, 176
 dickopf-1, 287
 Dorsal, 176
 dorsalin, 296
 empty spiracles (ems), 177
 engrailed (en), 177, 178, 180, 199
 egl-1, 267
 even-skipped (eve), 177, 180
 eyeless, 314, 315
 fused (fu), 177
 fushi tarazu (ftz), 177, 179, 180, 186
 « gap » 177, 178
 giant (gt), 178, 179
 gooseberry, 165, 284
 goosecoïd, 165, 228, 234, 235
 Grb10, 334
 gurken, 66-68
 H19, 334
 hairy 1 (h), 302, 309
 hedgehog (hh), 172, 177
 HOM (complexe) 182
 homéotiques 164, 181, 184, 188, 190, 193, 195, 201, 318
Hoxa, -b, -c, -d, 187, 191, 194, 195, 199, 200, 295
 HOX -A, -B, -C, -D 188 et suiv
huckebein (hkb), 177
hunchback (hb), 64 à 66, 178 et suiv., 186
integrated, 171
Jagged, 173
knirps (kni), 174, 175, 177, 179
Krüppel (kr), 175, 177, 179, 184
Labial, 183
lefty, lefty 1, -2, 167, 307
LHx9 (LIM homeobox 9 gene), 352
lim (Xlim), 165, 233, 200, 237, 287, 288
lhx-1, 200
Lmx1, 199
Macho -1, 209
 maîtres 163
msx1/2 299
Mesp2, 302, 304
Mesp2/c – Meso1, 301, 309
 mx, 165
 mxl, 165
 mx1/2 165, 229
 MRF4, 331
 Myf-5, 330-331
 MyoD, 330, 331
 Myogenin, 331
 Nanog, 342
 nanos, 64, 66, 176, 348
 nodal (voir aussi Xnr) , 308
 noggin, 235, 269
 Notch, 301
 nudel, 68
 Oct3/4, 349
 Oct4, 217, 341- 343
 odd paired (opa1), 177, 180
 odd skipped (odd2), 177
 organisateurs 341
 orthodenticle (otd), 177
 oskar, 66, 186, 348
 Otx1/2 (XOtx), 164, 200, 213
 « paired box », 314
 paired (prd), 177, 200, 314
 pair-rule, 177, 178 et suiv.
pangolin (pan), 177
 paralogues 188, 190, 201
patched (ptc), 177
Pax, 165, 187, 200 , 300 , 316
Pax 2, 357
Pax 3, 296
Pax 4, 201
Pax 6, 201, 296, 312 à 316
Pax 7, 296
Pax 8, 357
Pax 9, 201
Pintavallis, 288
pipe, 68
Pitx (1/2), 164, 200, 202, 307, 308
Pmar 1, 213
 postérieurs 191
Raldh2, 305, 309
 régulateurs 164, 187, 286
runt (run), 177
 Rx, 313
salm, 186
 sélecteurs homéotiques 129, 181 et suiv.
 187
Sex-comb reduced, 184, 194

Index

- siamois*, 165, 166, 228, 233 à 236, 241, 287
Six 3, 313
sloppy – paired (slp), 177
smad, 165
small eyes, 314, 316
snail, 176, 209, 255, 307- 308
Sonic hedgehog, 170, 196
Sox, 165
Sox 2, 313, 341, 342
Sox 7, 165
SOX9/ Sox9, 366, 368, 374
SRY/Sry, 363 et suiv.
soumis à empreinte 334
tailless (tl), 177
tardifs 325, 329, 333
Tbox, 209
Tolloid, 176
torso, 68
twin, 165, 233, 287
twisted, 176
Ultrabithorax, 183 à 186
VegT, 229, 231
vent1/2 (Xvent), 165, 289
Vg1, 235
windbutel, 68
wingless (wg), 171, 177, 180
Wnt, 171,
WNT4, 352, 368, 369
Wnt6, 300
Wnt7a, 199
Wnt8 (XWnt8), 239, 242, 289
WT1 (Wilm's Tumor gene 1), 352
Wunen, 351
XANF1, Xanf1, 287, 288
Xbra, 165, 229, 231,
XBlimp-1, 287
Xcat2, 56, 349
XFK-1, 288
Xhex, 287
Xhox2-9, 188
Xlim, 235
Xlim-1, 287, 288
XMyoD, 238
Xnot, 287, 288
Xnr-1, -2, -3, -4 (Xenopus nodal related genes) 169, 231, 236, 287, 294
X Otx-2, 287
Xtwin, 235
Xvent-1, -2, 289
Xwnt8, 235, 238, 289
Zerknullt, 176
Genitalia, 346
Génome embryonnaire, 239
Germarium, 62
Germinales primordiales, 346
Glycosyl-transférases, 257
Glaire cervicale, 75
Glande
 de Cooper, 23
 parathyroïde, 194
 thyroïde, 194
Gli (facteur de transcription), 172
Glycocalyx, 260
Glycogène synthetase kinase (GSK-3), 171, 232, 241
Glycosyl-transferase, 260
GMP cyclique, 315
GnRH (Gonadotrope Releasing Hormone), 27, 29, 42
Gonades, 3, 346 et suiv., (voir aussi ovaires et testicules)
Gonadolibérine, 27, 42, 372
Gonadotrophine, 27, 42, 44
 chorionique, 159
 hypophysaire, 44, 327, 372
Gonies, 7
Gonochoriques (espèces) 3, 359
Gonocytes, 356
 primordiaux, 346, 350, 351
Gononéphrotome, 126
Goosecoïd, 172, 236, 238, 241, 287 – 290, 292
Gouttière neurale, 124, 152, 246
Gradient vitellin, 206
Granules corticaux, 69, 84, 85, 87, 114, 147
 « P », 210, 218
Granulosa, 37 à 43
Greffes
 caille-poulet, 133
 nucléaires, 332, 335, 337
Gremlin, 269
Groucho, 68
Gurken, 66, 68
Gynandromorphisme, 360
Gynogénétique (embryon), 334

H

Hedgehog, 172, 351
 Hémochorial (oir placenta)
 Hémoglobine fœtale, 321
 Héparanes, 258
 Hermaphroditisme protandre, protogyne, simultané, successif, 3
 Hermaphrodites (espèces), 3
 Hétérochromosomes, 359
 Hétérogamétique (sexe), 3, 359 et suiv.
 Hexaparentale (souris), 218
 Histones, 19, 54, 61, 88, 221, 224, 335
 HMG (voir Boite)
 Holoblastique (voir segmentation)
 Homéoboite (*Homeobox*), 164, 183, 184, 314
 Homéodomaine, 64, 164, 183, 184
 Homéogène (voir gène homéotique)
 Homéosis, 181
 Homogamétique (sexe) 3, 359 et suiv.
 Horloge de segmentation, 300, 309
 Hormone (s) 266
 androgènes, 43, 44
 antimullérienne (AMH) 13, 30, 365, 368, 370, 371, 374
 folliculo-stimulante (voir FSH)
 gonadotrophine chorionique humaine (*Human Chorionic Gonadotropin*) 47, 159, 371
 lactogène placentaire, 159
 lutéotrope (voir LH)
 œstrogènes, 159
 peptidiques, 27
 placentaires, 159
 sexuelles (stéroïdes) 26, 27, 166, 367, 369
 stéroïdiennes, 166
 thyroïdiennes, 268, 271
 Hox (voir complexes et gènes)
 Hyaluronidase, 19, 46
 Hypoblaste, 103, 135, 138, 143, 149, 150, 216
 Hyponeuriens, 298
 Hypophyse, 26, 42
 Hypothalamus, 26, 42, 372

I

IGF (*Insulin-like Growth Factor*), 28, 29, 44
 Îlots sanguins, 141
 Immigration, 138
 Immunoglobulines, 249
 Inducteur(s) 193, 224
 céphalique, 280
 hétérogènes, 282
 Induction(s), 193, 247, 296
 de l'épiderme, 298
 du mésoderme, 224, 226, 230, 234
 embryonnaires, 273
 instructive, 281
 mésoblastogène, 275, 276
 neurale, 297
 neurogène, 274, 275
 permissive, 281
 primaire, 276
 secondaires, 310
 Information de position, 201, 318
 Inhibine(s), 13, 27, 28, 30, 39, 44
 Inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), 83
 Intégrines, 255 - 259, 263, 264, 285, 301
 Intercalation latérale, radiaire, 122
 Involution, 122, 245
 Ionophores, 93
 Izumo, 79

J

Jagged, 173
 Jonctions communicantes, (*gap junctions*, ou de type « gap »), 35, 37, 248, 251, 255, 256, 264, 284, 285
 d'adhérence, 35, 247
 d'ancrage, 248
 Juxtacrine (sécrétion), 283

K

Kératine Sak (Sperm Associated Keratin), 19
 Kinase cdc2, 60

L

Lames
 latérales, 126, 152
 extra-embryonnaires, 141
 Laminine, 256, 258, 261, 263, 270, 285
 Lampbrush (voir chromosomes)

Index

- Latebra, 131
L-CAM, 253
Lécithocèle
 primaire, 149
 secondaire, 150, 153
Leptotène, 7, 34
Lèvre blastoporale, 118, 245, 282, 290 ; 295
 dorsale du blastopore, 276, 289, 303
LH - Releasing Hormone (LH-RH), 27- 29, 42- 46, 371
Liaison homophile, 250
LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), 343
Ligne primitive, 136 – 141, 152, 155, 242
Lignée germinale, 348
Lipovitelline, 56
Liquor folliculi, 39
L-Maf (facteur de transcription), 313
Lobe polaire, 209, 210
Localisations cytoplasmiques, 69, 204 , 206, 210 (voir aussi déterminants)
Luteinizing Hormone (LH), 27
Lutéolyse, 46, 47
- M**
- Macho-1, 209
Macromères, 100, 105, 212
MAPs (*Microtubule Associated Proteins*), 61
Maskin, 91, 92
Masse cellulaire interne (MCI), 149, 153, 270
Matrice extra-cellulaire, 256, 264, 285
Maturation
 ovocytaire, 59 à 62
 des follicules ovariens 45
 du follicule de De Graaf 46
Méiose, 5 et suiv , 44, 59
Membrane
 coquillère, 131
 de fécondation, 84 – 86, 89, 115
 de Heuser, 150
 de Slavjanski, 37
 vitelline, 35, 69, 84 – 86, 108, 115, 131
Membres de Vertébrés (formation) 195 et suiv., 319
Ménopause, 34
Menstruations, 41
Mère porteuse, 337
Méroiistique (ovariole), 62
Mésencéphale, 126
Mésenchyme
 céphalique, 128, 277
 primaire, 106
 secondaire, 107
Mésentères, 128
Mésoblastogène, 274
Mésoderme, 102, 107, 110, 120, 128, 136, 138, 152, 176, 193, 215, 229, 237, 244, 274, 274
 axial, 138, 225, 226, 236, 275, 277, 287
 dorsal, 225, 237
 extra-embryonnaire, 137, 144, 153
 latéral, 226, 237
 para-axial, 129, 226, 293, 300 - 302
 précordial, 126, 128, 288, 290, 296, 312
 présomitique, 300, 301, 304, 309
 ventral, 225, 237, 289
Mésomères, 105, 212
Mésonéphros, 201, 347, 357
Métamère, 113, 129, 177
Métamérisation, 129, 141, 254
Métamorphose, 103, 271
Métanéphros, 201, 357
Métencéphale, 126
Méthylation, 92, 334, 340, 376
 des cytosines, 333
 d'une 7-méthyl guanosine, 92
 (voir aussi ADN)
Mi-blastula (voir Transition blastuléenne)
Microfilaments, 114, 247
 corticaux, 209
 d'actine, 69, 75, 85, 147, 207, 210, 235, 244, 246, 258, 292, 331, 333
Micromères, 105, 105, 212
Microphthalmie, 314
Micropyle, 108
Microtubules, 18, 66, 207, 209, 228, 244, 246
Migration (s) cellulaires, 259 – 263
 des cellules des crêtes neurales, 262 - 264
 des cellules germinales, 349
MITF (facteur de transcription), 313
MMPs (*métalloprotéases de dégradation des matrices*), 257, 261

Molécules d'adhérences (voir CAM)

Mort cellulaire 266

Morula, 100, 148

Mosaïque, 214, 319, 360, 376
sexuelle, 218

Mant, Mutation

antennapedia, 181

anucléolée, 240

bicoïd, 64

cactus, 177

Bithorax, 181

Deformed, 190

dominante négative, 168

knock-out, 167, 192

ntl (« no tail ») 290

small eyes, 314, 316

staggerer, 254

« *t* », 16

T 12, 241

T/T, 290

XXO, 372

mxl, 165

Myélocéphale, 126

Myf-5, 330

Myoblastes, 330, 331

MyoD (*Myoblast determination protein*)

320, 329, 330

Myogénèse, 329

Myogénine, 330

Myotome, 128, 201, 331

N

NAD kinase, 83

N-cadhérine, 253 – 255, 263, 264, 300,

Nanog, 341 – 343

Nanos, 176, 178,

N-CAM, 250, 254, 255, 278, 292, 318, 320

Nerfs crâniens, 191

Neuralisation, 292

Neurectoderme, 125, 138, 151, 152, 177

Neurogenin, 299

Neurula, Neurulation, 103, 139, 191, 214,
246, 300

Nexus 255

Ng-CAM, 250

Nidation, 47, 148, 150, 153, 156, 254, 270

Nodal, 169, 172, 234 – 236, 241, 287, 294,
295, 307, 308

Nœud

antérieur, 150

de Hensen, 136, 138, 141, 150, 151, 169,
195, 275, 290, 295, 303, 307

postérieur, 150

Noggin, 173, 213, 235, 240, 263, 269, 287,
290 – 294, 296, 299, 300

Notch, 173, 300 – 302, 307

Noyau de Pander, 131

Nuage mitochondrial, 55, 69

Nucléoles surnuméraires, (voir aussi Ampli-
fication), 53

Nucléoplasmine, 335

O

Oct – 4, 217, 341, 343,

Œil, 286, 294, 310 et suiv.

Œstradiol, 27, 39, 43 et suiv.

Œstrogènes, 43 – 45

Œstrone, 43

Œstrus, 41

Œufs, 68 – 70, 80 – 82, 113 – 116, 130, 146

alécithe, 57, 99, 10, 147

à régulation, 206, 211

« en mosaïque », 206

centrolécithe, 100, 102, 108

hétérolécithe, 48, 57, 99, 114

oligolécithe, 99, 105

éolécithe, 100, 131

Omphalo-placenta (placentation vitello-cho-
rionique), 155

Oncogènes, 344

Opsine, 315

Organisateur nucléolaire, 52

Ostium, 358

Ovaires, 35, 62, 66, 256, 368

de type creux, 356

de type plein, 357

Ovarioles, 62

Oviducte, 131, 358

Ovocytaires (Synthèses), 48 et suiv., (voir
aussi Maturation)

Ovocyte(s), 4, 5, 33 et suiv., 40, 131,

énucléé, 337

greffé, 337

Index

- Ovogenèse, 32 à 72
Ovogonies, 4, 32, 40, 356 – 358,
 primaires, 356
Ovulation, 39, 47
Ovules, 3, 32, 69, 73, 131
- P**
- Pachytène, 7, 51
Panoïstique (ovariole), 62
Parabiose, 283
Paracrine (action), 283
Parasegment, 177, 178, 180
Paraxis, 301, 305
Parthénogenèse, 93, 334
Pax, (voir gènes)
P-cadherine, 254
Pédicule
 allantoïdien, 152, 350
 embryonnaire, 153
 vitellin, 140, 152
Pelle, 67, 68
Périblastula, 102
PH20 (récepteur), 78
Phanères, 126
Phase lutéinique (ou lutéale), 46, 47
Phénotype sexuel, 361
Phosphatase alcaline, 19, 349
Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP2), 83, 84
Phospholipase C (PLC), 83
Phosvitine, 56
Photorécepteurs, 315
Pièce intermédiaire (mésoderme de la neurula), 126, 128, 152, 196
 (voir aussi Spermatozoïde)
Pipe, 67
Placenta, 27, 147, 155, 156
 allanto-chorionique, 157
 conjunctivo-chorial, 159
 cotylédonaire, 159
 décidué, 159
 diffus, 157
 discoïdal, 159
 endothélio-chorial, 159
 épithélio-chorial, 157
 hémo-chorial, 159,
 indécidué, 157
 vitello-chorionique, 154
 zonaire, 159
Placode(s), 126, 286
 cristalliniennes, 311
 olfactives, 294
 sensorielles, 124
Plakoglobine, 252
Plan de symétrie bilatérale, 213, 214, 216
Plaque
 cordale, 151
 focale d'adhérence, 259
 neurale, 124, 152, 246, 247, 296, 312
 précordale, 279, 293
Plaquettes vitellines, 115
Plasmalemma, 114, 115
Plasme
 germinatif, 55, 70, 116, 206, 210, 348, 349
 polaire, 70, 348
Pluripotence cellulaire, 341
Pluteus (larve), 106
Polarité
 animale, 219
 animale-végétative, 69, 206
 antéro-postérieure, 177
 céphalique, 287
 céphalo-caudale, 202, 279
 de l'ovocyte, 64 - 68
 disto- proximale (membre de vertébré), 195 - 202
 dorso-ventrale, 174 à 177, 206, 215, 219, 295, 296
 postérieure, 65
Polyadénylation (voir aussi ARN-m), 62, 91
Polycomb, 341
Polyembryonnie, 217
Polyspermie, 81- 85, 87
Poly T (poly thymidilique), 328
Polytènes (chromosomes), 63
Polytrophique (ovariole), 62
Ponte ovulaire, 40, 46, 69
Ponts cytoplasmiques, 15, 33, 35, 63
Pouvoir fécondant, 22
PRC (*Polycomb Repressive Complex*), 342
Prégnénone, 43, 368, 370
Préleptotène, 5, 7, 15, 33
Prévitellogenèse, 41, 48, 51, 53

Progestérone, 27, 39, 43, 46, 47, 60, 157, 159, 372
 Prolactine (PRL), 28, 45
 Prolongement céphalique, 136, 138
 Pronéphros, 201, 357
 Pronucleus
 femelle, mâle, 88, 89, 116
 Prosencéphale, 126, 296
 Prostaglandines, 46
 Prostate, 23
 Protamines, 19, 88
 Protéases, 13, 46
 Protéasome, 232
 Protéine(s)
 à homéodomaine, 164
 acides, 335
 c-mos, 61
 de choc thermique, 79
 de fusion, 79
 de ménage, 327
 G (Patched) 172, 315
 inductrices 164, 166, 290
 kinase A, 60
 kinase C 84, 283
 kinase calmoduline-dépendante, 61
 kinase cycline-dépendante (*cdc2*, *cdk2*), 61
 organo-spécifiques, 320
 Protéines (synthèses), 53, 58, 62, 90, 219 et suiv. 318
 Protéoglycannes, 256, 261
 Protocadhérines, 252
 Puberté, 34

Q

Quinacrine,, 24

R

Réaction
 acrosomique, 24, 75, 77, 78
 corticale, 84, 89
 fertilisine-antifertilisine, 74
 Récepteur(s)
 à activité tyrosine kinase, 259, 263, 283
 à activité sérine/thréonine kinase, 283
 à la testostérone, 371
 aux hormones thyroïdiennes, 166

de facteurs de type activine, 171
 des protéines BMP, 171
 des TGF- β , 171
 Eph, 173
 Frizzled, 171
 membranaires des TGF- β , 169
 TNFR-1, 269
 Xfr7, 171
 Région pseudo-autosomale,, 362
 Règle de colinéarité, 182, 183, 187, 195, 199, 201
 Régulation 204, 215, 216, 318, 319
 astérienne, 94
 chromosomique, 94
 des déficiences, 208, 209, 211, 213, 214, 216, 217, 318, 319
 des excédent,s 211, 215, 217, 218, 318, 319
 en retour (feed-back), 28
 Rempart germinatif, 133
 Replis amniotiques, 144, 139, 152
 Resact 74
 Rete ovarii, 356
 testis, 10, 355, 358
 Rétine 310, 313
 Rétinol, 310
 Rhombencéphale, 126, 129, 191, 192, 200
 Rhombomères, 129, 191
 Ronin, 342
 Rotation
 d'équilibration (ou d'orientation), 89, 116
 de symétrisation, 116, 225, 228, 232 - 235
 Repli céphalique, 139,

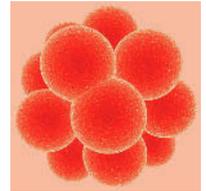
S

Sac vitellin, 350
 SCF (*Stem Cell Factor*), 351
 Schizocœlie, 126
 Sclérotique, 310, 311, 314
 Sclérotome, 128, 129, 330
 SDF1/Sdf1 (*Stromal-derived factor-1*), 350, 351
 SED1, 77
 Segmentation 99, 133, 204, 222, 223, 242
 de type radiaire, 100, 105
 de type spiral, 100, 209
 discoïdale, 102, 133

Index

- égale, 100
 - holoblastique (ou totale), 100, 117, 148
 - inégaie, 100, 117
 - partielle (ou méroblastique), 100, 102, 133
 - rotationnelle, 100, 149
 - sub-égale, 105
 - superficielle, 102, 108
 - Senestrogyre, 70
 - Séquence
 - consensus, 183
 - poly (A), 91
 - UUUUAU 91, 92
 - Séreuse amniotique, 177
 - de Von Baer, 144
 - Sérine/thréonine kinase, 283
 - Serrate, 173, 301
 - Sexe
 - génétique, 359, 360, 369
 - morphologique 360
 - SF1 (*Steroidogenic factor 1*) 352, 368, 374
 - Siamois 164, 165, 166, 228, 233, 234, 235, 236, 241, 287
 - Sinus rhomboïdal, 141
 - Slug, 300
 - Smad, 165, 169, 171
 - Smoothened, 172
 - Sog, 298
 - Somatopleure, 126, 128, 144
 - des lames latérales, 197
 - extra-embryonnaire, 157
 - Somites, 124, 125, 128, 129, 141, 152, 197, 201, 256, 263, 300 -, 302, 319, 330
 - Somitogenèse, 300, 303, 304, 309, 310
 - Somitomères, 300
 - Sonic hedgehog, 172, 198, 200, 263, 295, 296, 307, 308, 312, 317, 330
 - Souris transgéniques, 193, 201, 218, 344
 - Spätzle, 68
 - SP56, SP95, 77
 - SPAM-1 (SPerm Adhésion Molécule-1), 78
 - Spécification, 274
 - Sperm-associated keratin 57 (Sak 57), 19
 - Spermaster, 88, 116
 - Spermathèque, 108
 - Spermatides, 12, 16, 17
 - Spermatocytes, 14, 15 – 16
 - Spermatogenèse, 10 et suiv.
 - Spermatogonies, 4, 14, 15, 344
 - primordiales, 354
 - Spermatozoïde, 4, 19 et suiv., 73
 - Spermiation, 13, 19
 - Spermiogenèse, 5, 16
 - Splanchnopleure, 126, 128, 144
 - SRY/Sry (Sex-determining Region of the Y chromosome), 353, 366, 367, 368
 - Stade trèfle, 209
 - STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), 217
 - Stéroïdogenèse, 44, 365
 - Structure syncytiale, 210
 - Strypsine 149
 - Synapsis, 8
 - Syncytiotrophoblaste, 157, 159
 - Syndrome
 - de Klinefelter, 25, 360
 - de Turner, 360
 - du Testicule féminisant (TFm), 25
 - Système Delta/Notch 284
 - nerveux, 296
- ## T
- Tache de maturation, 59, 114
 - Taline, 258
 - Tbx («Tbox»), -4, -5, -6, 165, 209
 - Tcf-3, 165, 235
 - TDF (*Testicular Determining Factor*) 362
 - Téleencéphale, 126, 192
 - Téломérasés, 339
 - Télotrophique (ovariole) 63
 - Telson, 68, 113
 - Tenascine, 256 - 258
 - Tératocarcinomes, 341
 - Territoires neurectodermiques, 110
 - Testicule, 10 – 14, 352, 368, 373
 - à cystes, 355
 - féminisant, 372
 - tubulaire, 355
 - Testostérone, 11, 27, 28, 43, 355, 370 - 373
 - Tétrades, 7
 - TGF- β (Transforming Growth Factor β), 2, 30, 166, 168, 222, 224, 241, 287, 296
 - Thèque, 357, 367, 369
 - externe, 37, 41
 - interne, 37, 40, 43

- Thymus, 194
 Thyroxine, 314
 TIMPs, 261
 Tissu
 cible, 193, 280
 inducteur, 280
 interstitiel, 10, 11, 27, 355
 réacteur, 280
 TNF α (*Tumor Necrotic Factor α*), 28
 Toll, 68, 176
 Torpedo, 67
 Torso like, 68
 Tractus génitaux, 346
 Traînée spermatique, 115, 116
 Transduction de signaux, 81, 166, 283, 284
 Transferrine, 30
 Transformation antérieure, postérieure 194, 195
 Transgenèse, 167
 Transgénique, 218
 Transition blastuléenne (voir aussi mi-blastula), 55, 117, 118, 205, 222, 226, 230, 231, 239, 286, 289, 326 - 330
 Transplantations nucléaires, 336
 Triploblastique, 102
 Trophectoderme, 149, 157, 216
 Trophoblaste, 149, 153, 159
 Tube(s)
 droit(s), 10, 11, 358
 nerveux, 125, 126
 neural, 152, 246, 296
 (tubules) séminifères, 10 - 14, 355
 Tubuline 19, 54, 246, 292
 Tyrosine dopa-oxydase, 321
 Tyrosine-kinase, 259, 263
- U**
 Urètre primaire (et secondaire), 357
 Urospermiductes 359
 Utérus 358
 3'UTR 91
 3'-UTR (3'-untranslated région) 56
 Uvomoruline 253
- V**
 Vagues spermatogénétiques, 14
 Vasa., 348
 VegT 55, 69, 165, 169, 229 - 231, 236, 242
 Vésicule
 allantoïdienne, 155
 céphalique, 125, 126
 crislallinienne, 311, 313
 germinative, 34, 46, 59, 206, 207
 optique, 286, 310, 312, 313, 316
 proacrosomique, 17
 séminal, 23, 359
 vitelline, 143, 152, 153, 155
 Vgl, 55, 56, 169, 229, 234 - 237, 241, 287, 289, 294
 Vinculine, 252, 258
 Vitellarium, 62
 Vitellogenèse, 41, 48, 51, 53, 56, 57, 63
 Vitellogénine, 56
 Vitellus, 56, 131, 143
 Vitronectine, 263
 Voies génitales, 373
- W**
 Wnt, 171, 172, 197, 232, 241, 296, 297, 303, 331
- X**
 XOtx-2 287
 XFKH-1 288
 Xfr7, 232
 Xhex 287
 Xnr 172, 229, 236, 294, 299
 Xwnt8, 236, 238, 239, 289, 294, 295, 297,
- Z**
 Zona radiata 36
 Zone (membrane ou aire) pellucide, 35
 à activité polarisante (*of Polarizing Activity*), ZPA, 198 - 200
 de jonction, 133
 de recouvrement, 133, 198
 pellucide 69, 76, 77, 78, 147
 Zone marginale 224, 225, 226, 280
 dorsale 293
 postérieure 136, 216, 242
 ZP1, -2, -3, 77, 87
 Zygote 73, 80
 Zygotène 7, 34



7^e édition

Albert Le Moigne
Jean Foucrier

BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT

Ce manuel est destiné aux étudiants en Licences ou Masters de Sciences de la Vie, aux candidats aux concours de l'enseignement secondaire ainsi qu'aux élèves des classes préparatoires aux grandes écoles.

La découverte, ces dernières années, de gènes organisateurs du développement communs à tous les Métazoaires a permis de faire progresser considérablement notre connaissance des mécanismes du développement. Des concepts sont ainsi apparus, applicables à l'Homme et aux autres espèces animales. C'est dans cet esprit que le cours de Biologie du développement a été révisé et augmenté pour cette septième édition.

L'ouvrage aborde : la gamétogenèse et la fécondation ; la description des premières étapes du développement de quelques espèces choisies comme modèles ; la mise en place des plans d'organisation, l'acquisition de polarités et l'analyse des mouvements morphogénétiques régissant la construction embryonnaire ; la succession des phénomènes d'induction ; l'importance de l'apoptose dans le modelage de l'embryon ; la mise en évidence de la totipotentialité des noyaux des cellules somatiques et de son maintien avec ses applications concernant le clonage ; la détermination génétique du sexe et la différenciation sexuelle qui en découle.

ALBERT LE MOIGNE
est professeur honoraire de
l'université Paris XII Val-de-
Marne.

JEAN FOUCRIER
est professeur à l'université
Paris XII Val-de-Marne.

