

AVANT-PROPOS

Ce sont mes étudiants qui m'ont amené à écrire ce livre. Voilà plusieurs années qu'ils me demandaient de leur conseiller un livre d'exercices de biologie du développement et je n'en connaissais pas.

J'ai donc commencé la rédaction d'un ouvrage d'exercices dans l'esprit des sujets que je donnais régulièrement au PACES, ainsi que dans les différents niveaux du LMD où j'enseigne. La première édition de ce livre d'exercices intitulé « Bases cellulaires et moléculaires du développement – Méthodes et exercices » a été publiée en 2009. Une quatrième édition, revue et augmentée vous est maintenant également proposée.

Encore fallait-il, dans un premier temps, écrire un premier tome qui expose les principes et les concepts de la biologie du développement moderne tels que j'essaie de les transmettre, depuis quelques années maintenant, dans mes amphithéâtres. La première édition de ce livre de cours intitulé « Bases cellulaires et moléculaires du développement » a été publiée en 2007.

Une troisième édition, revue et augmentée vous est proposée ici, et est d'autant plus justifiée, au moment où une nouvelle réforme des études de santé se met en place, caractérisée par une réduction drastique des heures d'enseignements scientifiques, amenant au final, à une baisse du niveau de formation scientifique initiale.

Chacun pourra y prendre ce qu'il souhaite : il permettra aux étudiants de 1^{er} cycle de se familiariser aux concepts et d'acquérir les bases fondamentales de la biologie du développement, mais permettra également aux étudiants des cycles supérieurs ainsi qu'aux chercheurs, de mettre à jour leurs connaissances concernant les développements les plus récents d'une discipline en constante évolution.

Au fil de l'ouvrage, des passages imprimés en caractères italiques mettent l'accent, suivant les cas, soit sur des rappels de biologie cellulaire et de biologie moléculaire nécessaires à une compréhension claire des mécanismes du développement, soit sur des approfondissements de notions plus spécialisées. Ces dernières intéresseront plus particulièrement les étudiants des cycles supérieurs.

Le premier chapitre pose les concepts généraux de la biologie du développement. L'étude de l'embryologie descriptive de quelques organismes modèles (drosophile, amphibien, oursin, oiseau et mammifères) est ensuite abordée. Le modèle amphibien est retenu pour l'étude des mécanismes conduisant à la mise en place des plans d'organisation au cours de la segmentation, ainsi que pour l'analyse des phénomènes d'induction entraînant la construction de l'embryon tridermique. La mise en route du génome embryonnaire lors des phases précoces du développement est analysée à la lumière de nouvelles données expérimentales. Elles concernent les mécanismes de répression et d'activation des gènes zygotiques mettant en jeu des enzymes de remodelage de la chromatine. La notion de cellule souche est également abordée.

S'appuyant sur les expériences classiques de l'embryologie expérimentale, la fonction des molécules initiant et régulant la mise en place des trois axes de l'embryon (dorso-ventral, antéro-postérieur mais également droite-gauche) est abordée de manière détaillée grâce aux techniques de la génétique moléculaire. L'importance des gradients de morphogènes dans le développement est soulignée aussi bien au niveau de l'embryogenèse précoce qu'au niveau des phénomènes plus tardifs de l'organogénèse. Dans ce contexte, pendant la gastrulation, l'implication de la lèvre dorsale du blastopore dans la régionalisation du mésoderme, et plus généralement dans l'organisation embryonnaire, initialement mise en évidence par Spemann et Mangold en 1924, est revisitée à la lumière de concepts émergents. Un concept nouveau, comme celui de l'existence d'un centre organisateur ventral, permet en effet une compréhension de plus en plus précise, au niveau moléculaire, des mécanismes régulant la régionalisation et la spécialisation progressive des feuilletts embryonnaires.

Dans la dernière partie, les mécanismes de l'organogénèse, conduisant à la formation progressive de différents tissus ou organes, sont analysés à partir de quelques exemples précis, choisis dans différents modèles animaux pour leur pertinence. La construction du système nerveux central, l'organogénèse de l'œil, la somitogénèse et la formation des membres, sont abordées de manière détaillée en s'appuyant sur les modèles animaux (drosophile, amphibien, poulet ou mammifère) les mieux appropriés pour cette étude.

Chapitre 1

Étapes et mécanismes fondamentaux du développement et de la différenciation

1.1. Les étapes du développement

L'étude du développement embryonnaire englobe la description morphologique des transformations conduisant l'œuf fécondé à un organisme pluricellulaire, et l'étude des mécanismes impliqués dans la construction de cet organisme complexe. Le développement embryonnaire, ou embryogenèse, est composé de quatre étapes s'effectuant successivement mais dont les modalités peuvent varier en fonction de l'espèce : la fécondation, la segmentation, la gastrulation et l'organogenèse.

L'œuf fécondé, ou zygote, issu de la fusion du gamète mâle et du gamète femelle s'engage rapidement dans la segmentation. C'est le passage d'un état unicellulaire à un état pluricellulaire. La segmentation est caractérisée par une suite de divisions rapides et rapprochées, à interphases très courtes où le génome embryonnaire s'exprime peu.

Ces divisions clivent l'œuf en un certain nombre de cellules filles (ou blastomères) sans engendrer un accroissement notable de son diamètre. Au cours de la segmentation l'œuf se creuse, dans la majorité des cas, d'une cavité, le blastocœle, et devient une blastula.

La gastrulation, qui correspond à la mise en place dans l'embryon des feuilletts fondamentaux (ectoderme, mésoderme et endoderme) des métazoaires, peut alors commencer. Pendant la gastrulation, l'activité mitotique des blastomères se ralentit et les cycles cellulaires s'allongent, le génome embryonnaire s'exprimant de manière importante. La gastrulation est caractérisée par des mouvements morphogénétiques entraînant la migration de groupes de blastomères les uns par rapport aux autres, aboutissant chez certains invertébrés (Cœlentérés) à la ségrégation de deux feuilletts distincts : un

feuillet externe, l'ectoderme et un feuillet interne, l'endoderme. Ce sont des embryons diblastiques.

Chez la plupart des métazoaires, un troisième feuillet se met en place en position intermédiaire entre l'endoderme et l'ectoderme : c'est le mésoderme. L'embryon est alors triblastique. L'individualisation progressive du feuillet mésodermique est le résultat de phénomènes d'induction du feuillet endodermique, déterminé très précocement, comme nous le verrons dans les chapitres suivants, sur le feuillet ectoblastique qui est compétent, c'est-à-dire apte à recevoir le signal inducteur.

Après la gastrulation s'engage une période d'organogenèse et d'histodifférenciation où le plan d'organisation de l'espèce et les ébauches d'organes se mettent en place. Cette période, qui commence par la mise en place du système nerveux (ou neurulation), est une phase de croissance importante du jeune organisme. La construction d'un organisme pluricellulaire cohérent est un phénomène progressif impliquant des mécanismes fondamentaux, que l'on retrouve dans toutes les espèces. Les mécanismes contrôlant la prolifération, les mouvements et la migration cellulaires, permettent des interactions entre des groupes de cellules éloignés les uns des autres pouvant conduire à une spécialisation cellulaire. Ils nécessitent une coordination cellulaire importante. La formation de cellules spécialisées est le résultat de deux grands mécanismes : les interactions cellulaires conduisant à des inductions et l'existence de déterminants cytoplasmiques. Ces molécules (ARN ou protéines) localisées de manière asymétrique dans le cytoplasme, orientent de manière spécifique le devenir de la cellule fille qui en hérite au moment de la mitose.

1.2. Les étapes de la différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire est le processus par lequel les cellules se spécialisent en un type cellulaire particulier, identifiable par l'expression de gènes spécifiques et par des caractéristiques morphologiques qui lui sont propres. Dans le corps humain, on décrit plus de deux cents types cellulaires distincts qui diffèrent très sensiblement les uns des autres par leur

organisation structurale et/ou fonctionnelle. Toutes ces cellules, qui sont issues par une succession de mitoses de la cellule initiale, l'œuf fécondé ou zygote, possèdent (à quelques exceptions près) le même matériel génétique. Cependant, elles diffèrent au niveau de l'expression de gènes spécifiques. La spécialisation cellulaire s'acquiert progressivement au cours du développement et plusieurs états cellulaires peuvent être distingués : la totipotence, la détermination et la différenciation.

La totipotence : la cellule totipotente peut donner naissance à tous les types cellulaires d'un organisme, et même à l'organisme entier, en fonction des conditions d'environnement auxquelles elle est confrontée. Le zygote apparaît donc comme la cellule totipotente par excellence. D'une manière générale, les cellules totipotentes sont caractérisées par un indice mitotique élevé et donc des cycles cellulaires courts avec des phases G1 et G2 réduites (et même dans certains cas, inexistantes). Le génome des cellules totipotentes est très largement inexprimé mais il est très accessible à tous les mécanismes de contrôle auxquels il répond rapidement. Etant donné que presque seuls les gènes de « routine », impliqués dans les mécanismes de la croissance et de la division cellulaire, sont exprimés chez les cellules totipotentes, celles-ci ne présentent pas de caractères morphologiques spécialisés.

La détermination : la cellule déterminée ne peut plus être à l'origine que d'une gamme limitée et précise de types cellulaires quel que soit l'environnement dans lequel elle se trouve. Des groupes de cellules déterminées peuvent s'associer pour former un champ morphogénétique, territoire qui ne présente aucun caractère morphologique spécialisé (par exemple le champ morphogénétique de l'œil, ou le champ morphogénétique du membre postérieur) mais dont le devenir est orienté de manière irréversible. Le modèle amphibien permet de mettre facilement en évidence la notion de champ morphogénétique (voir chapitre 7). L'acquisition par la cellule d'un état déterminé est un phénomène progressif mais qui, une fois acquis, est généralement stable et transmissible au fil des divisions de mitose. Le passage progressif de cellules totipotentes à des cellules pluripotentes puis à des cellules dont la détermination est irréversible, est dû à la limitation

progressive de la capacité d'expression du génome associé à un phénomène d'hétérochromatinisation de régions entières de celui-ci (Fig. 1.1).

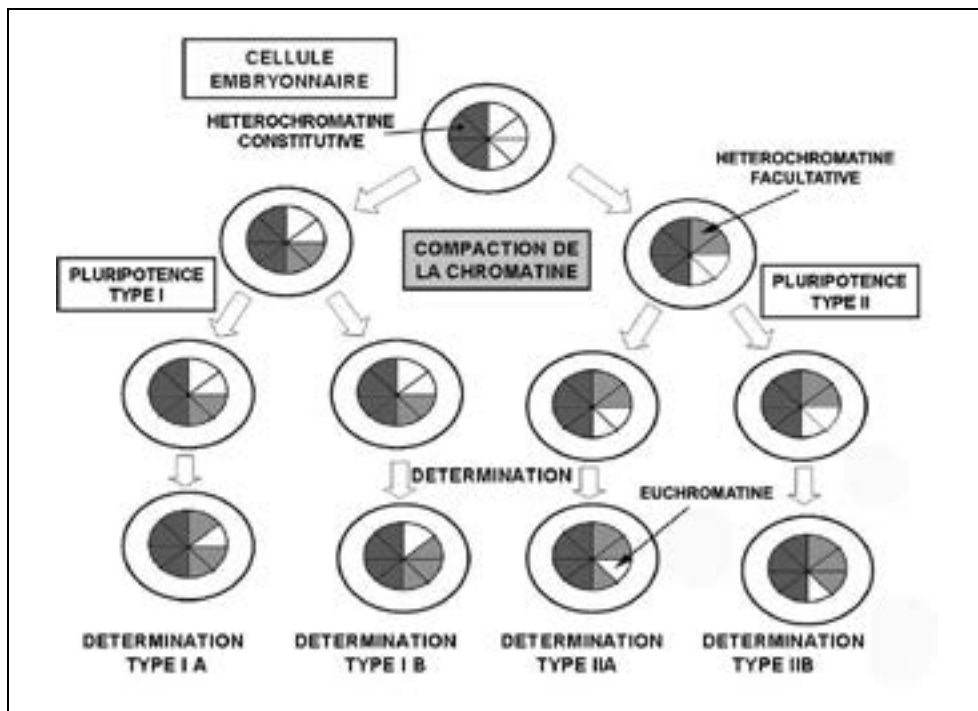


Figure 1.1 : Hétérochromatine et détermination.

Les cellules embryonnaires, comme toutes les cellules, ont une partie de leur chromatine qui demeure de façon permanente à l'état condensé : c'est l'hétérochromatine constitutive. Elle correspond à des séquences d'ADN répétitives qui n'ont pas de signification sur le plan transcriptionnel. Durant le passage de la totipotence à la pluripotence et à la détermination, des groupes de gènes, initialement non transcrits mais susceptibles d'être rapidement mobilisés en début de segmentation, sont inactivés par compaction de la chromatine : on parle alors d'hétérochromatine facultative. Cette hétérochromatinisation est durable, une fois acquise elle est transmise de génération cellulaire en génération cellulaire. Elle se met en place progressivement au fur et à mesure de la détermination dans les différents groupes de cellules sous le contrôle de facteurs internes (déterminants cytoplasmiques) ou d'événements extérieurs à la cellule (position de la cellule dans l'embryon, phénomènes d'induction). Des fractions plus ou moins importantes de la chromatine, différentes en fonction des cellules, prennent une forme compactée, et ne sont plus accessibles, d'une manière générale, à une activation par d'éventuels facteurs de transcription. Le résultat de ce phénomène global d'hétérochromatinisation durant l'embryogenèse est la mise en place de cellules caractérisées par des états de détermination différents, ne pouvant plus exprimer que des parties distinctes et limitées de leur génome (euchromatine), et dont la spécialisation est orientée de manière irréversible dans des directions différentes.

La différenciation : une cellule différenciée présente des caractères spécialisés immédiatement discernables tant au niveau morphologique qu'au niveau moléculaire. Elle est caractérisée par un cycle cellulaire long, voire par une perte totale du pouvoir mitotique. Plus précisément, la différenciation

s'établit au cours de la phase G1 du cycle cellulaire. Elle conditionne la durée du cycle, et peut même aboutir à son interruption. La réplication de l'ADN (et par conséquent la mitose) ne se produisant plus chez certains types cellulaires hautement différenciés, ceux-ci demeurent bloqués plus ou moins longtemps dans un état particulier de la phase G1 du cycle cellulaire, décrit comme une phase G0. En règle générale, l'état différencié est stable et non réversible. Outre les gènes de routine, gènes nécessaires au métabolisme de base et exprimés par toutes les cellules, la cellule différenciée n'utilise que 1 à 2% du programme génétique correspondant à des gènes codant des protéines «de luxe» très spécifiques.

Rappel : Le cycle cellulaire de la cellule eucaryote

Au sein d'un organisme pluricellulaire, quatre évènements fondamentaux sont susceptibles de marquer la vie cellulaire : la reproduction par division, ou mitose, l'expression du métabolisme général (anabolisme et catabolisme), une spécialisation éventuelle de la cellule constituant le phénomène de la différenciation, et enfin la mort cellulaire, résultant de mécanismes variés dont le phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose. Toutes les cellules de l'organisme fonctionnent suivant un cycle qui s'organise autour de la réplication de leur matériel génétique et où l'on peut distinguer deux étapes : la mitose (phase M), qui est une période marquée par la division cellulaire, et l'interphase, période d'activité métabolique importante. L'interphase est composée de trois étapes successives : la phase G1, la phase S, et la phase G2. La phase G1, ou phase post-mitotique, correspond au début d'un cycle cellulaire. Sa durée est très variable ; la phase G1 est plus ou moins longue en fonction du type cellulaire considéré et de l'environnement (abondance des nutriments et présence de divers facteurs de croissance).

La phase G1 est même inexistante dans le cycle des cellules embryonnaires aux stades précoces du développement (chez les amphibiens ou les diptères par exemple). Pendant la phase G1 les activités de transcription (synthèses d'ARN dans le noyau) et de traduction (synthèses de protéines dans le cytoplasme) sont intenses. D'une façon générale le métabolisme cellulaire est très actif, ce qui se traduit par l'accroissement très sensible du volume de la cellule.

C'est au cours de la phase S que l'ADN chromosomique est synthétisé dans le noyau de la cellule. Dans la mesure où le phénomène de réplication n'intéresse pas simultanément toutes les régions de toutes les molécules d'ADN du noyau, des activités de transcription se poursuivent dans le noyau durant toute la phase S ; des synthèses protéiques ont également lieu dans le cytoplasme. En phase S, chaque molécule d'ADN effectue sa réplication, on passe alors quantitativement de 2C ADN à 4C ADN. La phase G2 est une phase de relatif repos métabolique, bien que des activités de traduction s'y produisent encore ; la cellule achève de

dupliquer ses constituants. Enfin, la mitose débute par un phénomène assez rapide de répartition en deux lots des structures nucléaires (chromosomes) porteuses du programme génétique (c'est la « mitose » proprement dite), ainsi que des autres constituants cellulaires (cytokinèse).

La cellule initiale se divise ensuite en deux cellules filles qui se séparent (cytodiérèse). Ces deux cellules filles se partagent équitablement les différents constituants de la cellule mère. Le matériel génétique (ADN) ayant été répliqué pendant la phase S, la cellule qui subit la mitose possède 4C ADN. Les deux cellules filles issues de la mitose reçoivent chacune 2C ADN (Fig. 1.2).

Dans l'organisme pluricellulaire, la mitose permet d'assurer d'abord la croissance de l'individu au cours des phases embryonnaires, fœtales et juvéniles de la vie. Elle permet aussi de renouveler au fur et à mesure des besoins, les cellules de certains tissus. Enfin la mitose peut suffire à assurer la reproduction de certains organismes pluricellulaires, c'est-à-dire par reproduction asexuée. Pour un même organisme, la durée du cycle peut être très différente d'un type de cellule à l'autre. Les cellules embryonnaires, ou encore des cellules pathologiques (cellules cancéreuses) peuvent avoir un cycle particulièrement court (de 30 minutes à 1 heure). La plupart des cellules dont la différenciation est peu accentuée ont un cycle dont la durée est de quelques jours à plusieurs mois ; elles peuvent se renouveler par mitoses au sein des tissus dont elles font partie. C'est ainsi que chez certains mammifères, les cellules du foie (hépatocytes) ont un cycle qui peut durer un an. Enfin les cellules hautement spécialisées comme les cellules nerveuses (neurones) ou les cellules du muscle cardiaque, ont pratiquement perdu la capacité de se diviser, elles sont dites « permanentes ».

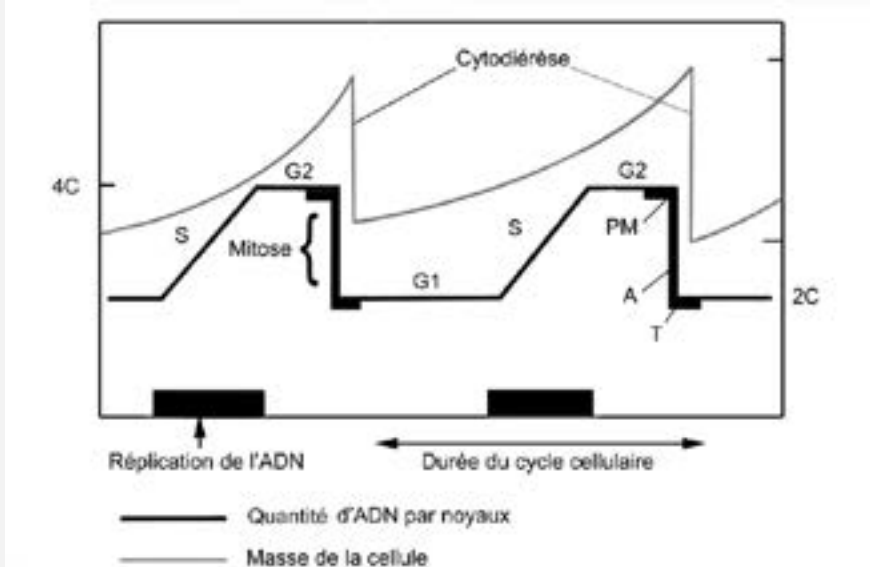


Figure 1.2 : Le cycle cellulaire de la cellule eucaryote.
 P : Prophase, M : Métaphase, A : Anaphase, T : Télophase.