

### Aspects cellulaires et moléculaires du développement précoce chez l'amphibien.

Avant même la fécondation, les ovocytes bloqués en Métaphase II de méiose présentent une partie pigmentée et une non pigmentée :

- Pôle animal pigmenté
- Pôle végétatif non pigmenté

2 gradients opposés : gradient de réserves vitellines dans le PV et gradient de RNP dans le PA.

De plus,

- Cytoplasme profond : réserves vitellines et RNP
- Cytoplasme superficiel = cytoplasme cortical : cytoplasme plus fluide, cytosquelette, pigments du PA

#### Le rôle du spz lors de la Fécondation :

- Amener un noyau haploïde
- Amener centrosome paternel

Le centrosome est composé d'un centriole distal pour la formation du flagelle (cf. cours de Rouiller Fabre), et le centriole proximal.

Ces deux centrioles associés au matériel périvitellulaire forment le centrosome.

Centriole père + centriole fils : 9 triplets de  $\mu$ tubules.

Présence d'appendices sup-distaux : ancrage aux  **$\mu$ tubules** (rôle du centrosome = organisation du réseau tubulaire)

Présence d'appendices distaux : ancrage aux **filaments actine** et/ou à la **membrane** lorsque cil ou flagelle.

La duplication du centrosome :

- Bourgeoisement orthogonal des 2 pro-centrioles perpendiculaires aux centrioles parentaux
- 4 centrioles donc 2 centrosomes chacun à un pôle du fuseau mitotique (les centrioles sont perpendiculaires)

⇒ Fonction **axonémale** (mise en place du flagelle) et fonction **centrosomique** (organisation du réseau microtubulaire) du centrosome paternel.

Attention :

En ED et pour Rouiller Fabre :

- Centriole distal  $\Rightarrow$  axonème du flagelle
- Centriole proximal  $\Rightarrow$  spermaster
- Centrioles distal et proximal  $\Rightarrow$  fuseau de 1<sup>ère</sup> division de segmentation

Dans ce cours :

- Centriole distal  $\Rightarrow$  axonème du flagelle
- Centrioles proximal + distal  $\Rightarrow$  spermaster
- Centrioles proximal + distal  $\Rightarrow$  fuseau de 1<sup>ère</sup> division de segmentation

#### Fécondation :

C'est la fusion des deux noyaux : noyau femelle et noyau male. La fécondation permet l'achèvement de la deuxième division de méiose et est associée à l'émission du 2<sup>ème</sup> GP. Il y a également une reconstitution de l'enveloppe nucléaire et l'entrée du centrosome mâle qui va former le spermaster.

L'élongation des  $\mu$ tubules du spermaster (aster de spz) va permettre l'entrée en contact des noyaux haploïdes femelle et male. Ils vont se déplacer vers le centre du zygote puis vont fusionner = *amphimixie*.

Pendant ce trajet, les deux noyaux se dupliquent : ils deviennent  $2n$  c'est à dire  $nK$   $2k$ . Le noyau, après mise en commun du matériel génétique mâle et femelle est donc  $4n : 2nK, 2k$ .

De plus, le centrosome apporté par le spz se duplique pour former les pôles de la division de méiose.

On a donc :

- ▶ Migration des noyaux
- ▶ Duplication de l'ADN
- ▶ Duplication des centrosomes

La 1<sup>ère</sup> division de segmentation aboutit à 2 blastomères avec rétablissement de la ploïdie de l'espèce. Ce mécanisme est valable chez le xénope et chez l'homme. Mais chez la souris :

- Le centrosome du spz est inactif, il ne forme pas d'aster et ne se duplique pas
- Les 1<sup>ères</sup> divisions chez la souris sont donc acentriolaires (jusqu'au stade 16, 32 cellules)

➤ La réaction d'équilibration :

Au moment où les ovocytes sont pondus, ils sont entourés d'une gangue de mucopolysaccharides qui s'hydrate au contact de l'eau.

Au moment de la fécondation, le décollement de la membrane de fécondation à la membrane plasmique (exocytose de granules corticaux) permet à l'ovocyte d'être libre. Il va y avoir formation d'un « culbuté », du à la densité des plaquettes vitellines dans le PV : le PA est alors orienté vers le haut.

**Ce phénomène est purement passif : sous l'effet de la gravité, les ovocytes libres suite à l'exocytose des granules corticaux s'orientent PA vers le haut du à la densité des plaquettes vitellines concentrées dans le PV.**

➤ La réaction corticale :

Rotation corticale : formation du croissant gris.

Le spz entre préférentiellement dans le PA car la densité des récepteurs nécessaires à la reconnaissance entre spz et ovocyte est très importante dans cette région.

Quelques minutes après la pénétration du spz, il y a déplacement du cytoplasme cortical par rapport au cytoplasme profond. Il y a alors formation du croissant gris, partiellement dépigmenté. On peut alors définir un deuxième axe : l'axe dorso-ventral ; cet axe étant perpendiculaire à l'axe PA/PV. Le croissant gris forme la future région dorsale.

**Le croissant gris apparaît à la suite de la rotation du cortex, le cytoplasme superficiel bascule (dépigmentation superficielle) alors que le cytoplasme profond reste immobile. Le spermaste (donc les microtubules) serait responsable de ce mouvement relatif.**

La segmentation : Passage d'un stade unicellulaire à un stade pluricellulaire

- ▶ La division de l'ovocyte fécondé aboutit au zygote
  - Lors de la première division, l'ovocyte se divise de façon égale : 2 blastomères de taille égale
  - La deuxième division : 4 blastomères identiques avec un axe de division perpendiculaire au premier axe
  - La troisième division permet d'obtenir 4 micromères dans le PA et 4 macromères dans le PV
  - Les divisions se poursuivent
- ▶ L'embryon au stade blastula a la même taille que l'embryon de départ : il n'y a donc pas de croissance cellulaire. Il ne s'agit donc pas d'un cycle somatique (division + croissance) mais d'un cycle embryonnaire (uniquement division).

Cycles embryonnaires de segmentation

- \* Division mais pas croissance : absence de G1 et de G2
- \* Alternance de phase de synthèse S et de division mitotique M
- \* Le MPF : activité faible en S (synthèse de cycline B) et activité élevée en M (dégradation de cycline B). Qd le MPF est actif, phosphorylation de l'histone H1 et des lamines (disparition de l'enveloppe nucléaire pdt la mitose)
- \* Pas de transcription jusqu'à la transition blastulienne juste avant la fin de la segmentation. Il y a reprise de la croissance cellulaire et de la transcription au moment de cette transition.

Chez le xénope, au stade 6000 cellules s'effectue la transition blastulienne :

- Reprise des activités de transcription (attention, ne pas confondre transcription et traduction : avant la transition blastulienne il y avait traduction des ARNm maternels)
- Apparition des phases G1 et G2 qui permettent une croissance cellulaire (attention : avant la transition blastulienne, il y avait une interphase mais réduit à S)
- Premières désynchronisations cellulaires : les micromères se divisent plus rapidement que les macromères.

- ▶ Utilisation d'extraits cytoplasmiques de xénope : centrifugation des ovocytes

On va séparer 3 phases :

- Phase lourde : vitellus
- Phase intermédiaire : cytoplasme
- Phase légère : lipides

Si on analyse activité MPF :

- Chute très rapide du MPF après la fécondation
- Dégradation de la cycline B corrélativement à la baisse de l'activité du MPF

1<sup>er</sup> cycle de 90 min :

- synthèse de cycline B activité MPF basse
- transition métaphase anaphase avec division : augmentation de l'activité MPF et dégradation cycline B
- chute de l'activité MPF

Autres cycles : 30 min

a) extrait mitotique ⇒ K se condensent

t = 0 : activité MPF élevée constante

b) extrait interphasique ⇒ décondensation des chromosomes, reformation de l'enveloppe nucléaire = noyau  
t = 10 min après fécondation ou activation (décharge électrique) : activité MPF faible constante

c) extrait « cyclant » ⇒ noyau / chromosome / noyau / chromosome ...  
t = 60 min : activité du MPF faible mais le niveau de cycline B élevé entraîne l'activation du MPF.

En fin de blastula : formation d'une cavité = blastocoèle

Comment sont reliées les cellules entre elles ?

- ❖ Macromères : **cadhérines** = protéine transmembranaire qui permettent interaction entre 2 cellules et interaction MEC et le cytosquelette de la cellule
- ❖ Micromères
  - en surface, proche de la cavité du blastocoèle : interaction entre la MEC et les protéines transmembranaires : **intégrines** qui sont des hétérodimères = récepteurs à la fibronectine => adhésion à la MEC (très importante lors de la migration des cellules)
  - Sur les faces latérales des cellules : **connexines** qui forment des pores qui permettent le passage ions et de petites molécules : établissement d'un lien entre deux cellules : jonctions GAP
  - Partie apicale (au contact extérieur), **protéine de jonction (jonctions serrées = zonula occludens)** qui empêche passage de mlc entre les cellules
  - Cadhérines qui permettent d'attacher les micromères entre eux.

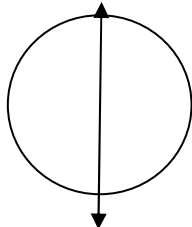
Au stade blastula, spécialisation de cellules pour le rapport entre elles, pour leur rapport avec le blastocoèle, pour le rapport à l'extérieur.

#### ► Expérience de Hans Speman

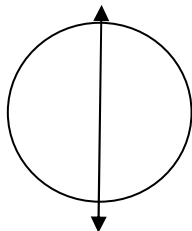
Coupe viable du zygote avant la 1<sup>ère</sup> segmentation

⇒ Mise en place de l'axe dorso-ventral

- Si on fait coupe perpendiculaire à l'axe PA / PV : 2 embryons normaux



- Si on fait coupe dans l'axe PA / PV : 1 embryon normal (croissant gris et PA) et 1 embryon anormal (PV)



Les deux régions d'une même cellule ne sont pas les mêmes.

Contenu : Cellules mésenchymateuses, cellules endothermiques

→ En l'absence de Croissant Gris, pas d'axe dorso-ventral ni de SN ⇒ rôle dans la régionalisation

#### ► Expérience de Nieuwkoop

Régionalisation

Au stade Blastula, les cellules sont identiques.

- Calotte du PA : cellules épidermiques
- ZMV : cellules sanguines
- ZMD : cellules musculaires
- Endoderme : cellules intestinales

Les cellules de la zone marginale ont déjà reçu une info en étant orientée vers une différenciation :

- ❖ Chorde ou mésoderme dorsal

- ❖ Cellules musculaires pour mésoderme intermédiaire
- ❖ Cellules sanguines pour mésoderme ventral

Régionalisation de cette zone intermédiaire

► Régionalisation de l'induction

1. Blastomère végétatif induisent les cellules sus-jacents à former les différentes **lignées mésodermiques**
2. La régionalisation de cette induction est déjà déterminée au stade blastula

► Expérience de Dale et Stach

Embryons au stade morula 32 cellules (micromères et macromères)

Dissection des différentes régions :

	Cellules	Feuillets
Calotte animale	Epidermiques	Ectoderme Pas de mésoderme
Calotte animale + macromère dorsal D1	Epidermiques Musculaires et de la corde Epithéliales	Ectoderme Mésoderme dorsal Endoderme
Calotte animale + Macromère ventral D4	Epidermique Sanguines, mésenchymateuses Epithéliales	Ectoderme Mésoderme ventral endoderme

DONC détermination différente des 2 blastomères identiques situés dans des régions différentes

Attention, cette expérience a été réalisée in vitro. In vivo, les molécules sécrétées par les blastomères végétatifs n'atteignent jamais la calotte animale mais régionalisent la zone marginale.

► Expérience avec des marqueurs fluo :

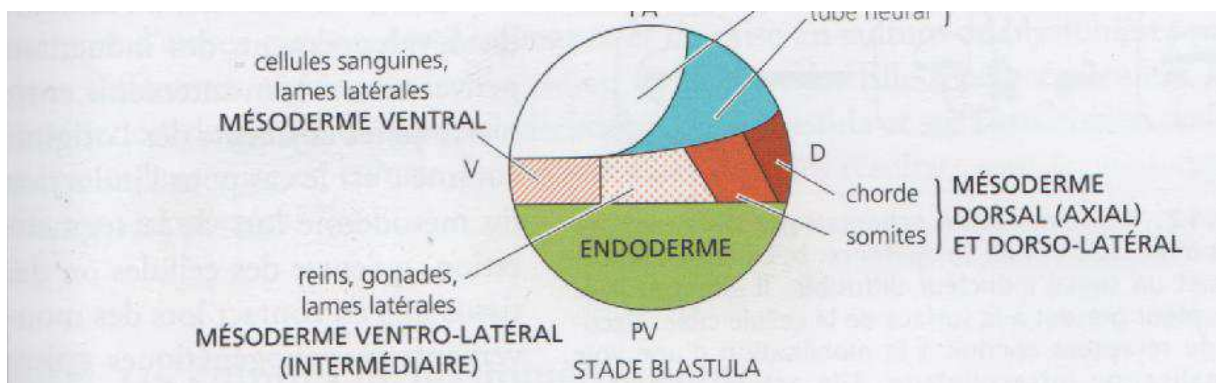
1. Si on marque les blastomères animaux, les cellules mésodermiques sont marquées
2. Si on marque les blastomères végétatifs, les cellules mésodermiques ne sont pas marquées

Les signaux induction du mésoderme proviennent des blastomères végétatifs et permettent de donner les lignées mésoblastiques par induction des cellules de la CA.

On peut construire la carte des territoires présomptifs à 1 stade blastula ou on peut montrer une régionalisation des blastomères dans l'étape de gastrulation

Donc des cellules inductrices envoient une information, elles synthétisent et sécrètent une ou pls mics. Ce sont les **blastomères végétatifs** qui envoient une information vers les **micromères de la zone marginale pour induire la formation du mésoderme**.

Parallèlement des cellules compétentes sont capables de recevoir cette information. Elles peuvent être des récepteurs ou des messagers cellulaires capables d'agir au niveau génomique.

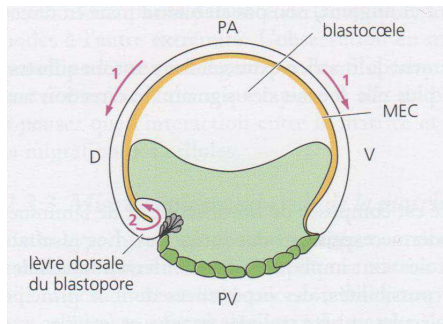


## La gastrulation

Mise en place des 3 feuillets primitifs : endoderme, mésoderme et ectoderme.

Mouvement de cellules : **prolifération et migration**. Les cellules prolifèrent migrent en surface, entrent dans l'embryon en formant une nouvelle cavité : l'**archentéron** (futur intestin).

- Invagination des cellules au niveau de la lèvre dorsale du blastopore. On **réduit alors la cavité du blastocèle**
- Prolifération et migration des cellules en surface, reprise des cellules au niveau de la lèvre dorsale et création d'une nouvelle cavité = **archentéron**
- A ce stade, mouvement d'invagination au niveau de la lèvre ventrale du blastopore : invagination des cellules le lg de la matrice, et l'ensemble des cellules=blastopore et l'ensemble des cellules de l'endoderme qui se rétrécit = **bouchon vitellin**.



Utilisation des marques colorées :

Si on colore les cellules en surface de l'embryon, on peut suivre l'évolution de ces cellules : étalement de la marque = prolifération des cellules qui héritent du colorant

La marque bleue : les cellules vont disparaître au cours du temps car elles entrent au niveau de la lèvre dorsale.

On peut alors reconstituer l'origine des cellules sur la carte.

En fin de gastrulation, blastocèle réduit, archentéron primaire, cellules du mésoderme, cellules du futur ectoderme et du futur neuroectoderme, cellules de l'endoderme.

Allongement dans la région dorso-ventrale => neurulation

## La neurulation

Épaississement de certaines cellules sur la face dorsale = **bourrelets neuraux**.

Puis enroulement et création de **la gouttière neurale**.

Fermeture du bourrelet neural pour former **tube neural**.

On a donc : en fin de neurulation

- Un tube neural avec le neurocèle
- Epiderme renfermé
- Régions des crêtes neurales
- Différenciation en **chorde** → **squelette** et **somites** → **muscles**

La neurulation correspond à des mouvements spontanés des cellules les unes par rapport aux autres et à des mouvements de cellules entre elles : intervention du cytosquelette avec allongement des microtubules selon axe antéro-postérieur (microtubules parallèles dans la cellule depuis le noyau vers l'extrémité apicale) et compaction des faisceaux d'actine dans la région apicale. C'est la contraction des faisceaux d'actine qui permet la fermeture du tube neural.

Après la neurulation :

- 
- 
- Ectoderme = peau et cellules nerveuses
- Mésoderme = squelette, muscle, rein, cœur et vaisseaux
- Endoderme : intestin, foie et poumons

le plan d'organisation est commun à tous les vertébrés.

Les trois feuillets sont mis en place :

Les 3 axes sont en place : antéro-postérieur, dorso-ventral et médiolatéral.