

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

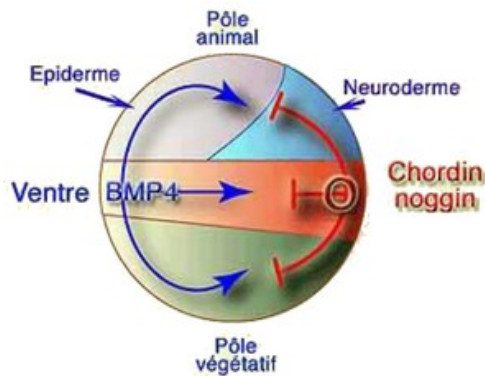
Cours 3

Rappels :

Il y a une régulation de la dorsalisation au stade blastula et gastrula par des facteurs de croissance, avec un rôle majeur des FGF et TGF β .

| | |
|---------------------|--|
| famille FGF | ■ Facteur de croissance |
| famille TGF β | ■ Facteur de transcription |
| Vg1: + | ■ Facteurs cytoplasmiques |
| Activine A: +/- | |
| Nodal: + | |
| Wnt: + | Dsh – GSK3 – β -caténine – siamois |
| | Noggin - chordin |
| BMP: + | smad |

Il y a un effet antagoniste des facteurs dorsalisants (chordin, noggin) et ventralisants (BMP4), qui revêt une grande importance dans le développement.



Organogénèse du mésoderme : exemple des muscles.

1. Formation du mésoderme :

Le feuillet moyen, le mésoderme, se retrouve entre l'ectoderme et l'endoderme au cours de la gastrulation.

L'organogénèse du mésoderme s'amorce pendant la neurulation.

Les différentes portions du mésoderme et leur devenir:

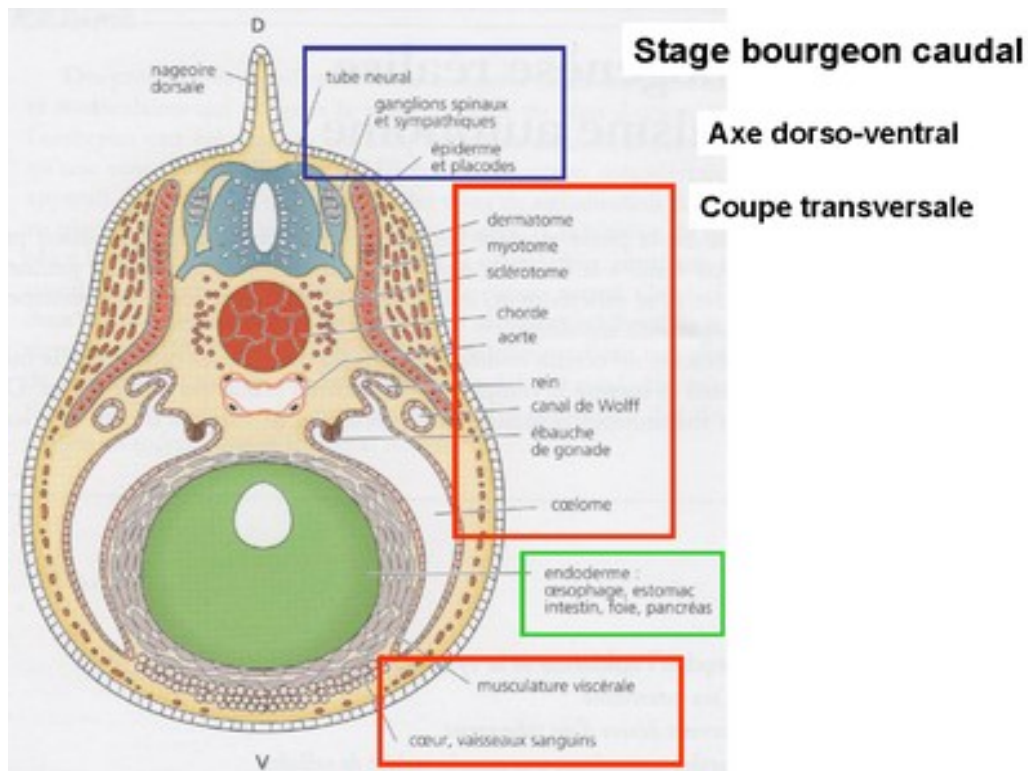
Région antérieure : donnera du **mésenchyme céphalique** qui donnera lui-même le tissu conjonctif et les muscles de la face

Sur l'axe dorsal antérieur-postérieur : on parle de **mésoderme somitique**. Il donnera du tissu conjonctif, de l'os, du cartilage, du derme des muscles.

Le **mésoderme des pièces intermédiaires** (entre les somites et les bords latéraux de l'embryon) donnera le système et les conduits génitaux.

Le **mésoderme des lames latérales** donnera le système vasculaire, le cœur, les cellules sanguines, les parois des cavités cœlomiques, des composants des membres (pas les muscles).

[l'épithélium de revêtement des poumons n'est pas d'origine ectodermique, mais endodermique.]

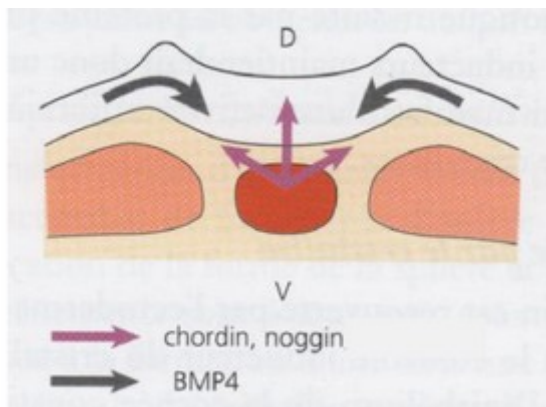


Embryon après la neurulation.

La chorde forme l'axe antéro-postérieur de l'embryon et dirige l'organogénèse. C'est un axe antéro-postérieur spécifique des vertébrés. C'est autour de la chorde, qui disparaîtra, que vont s'assembler les vertèbres.

Les somites, qui dérivent du mésoderme para-axial, contribuent à la formation du squelette, des muscles et du derme. Ils sont présents sur toute la longueur de l'embryon.

Comment se forment les somites?



Neurula précoce

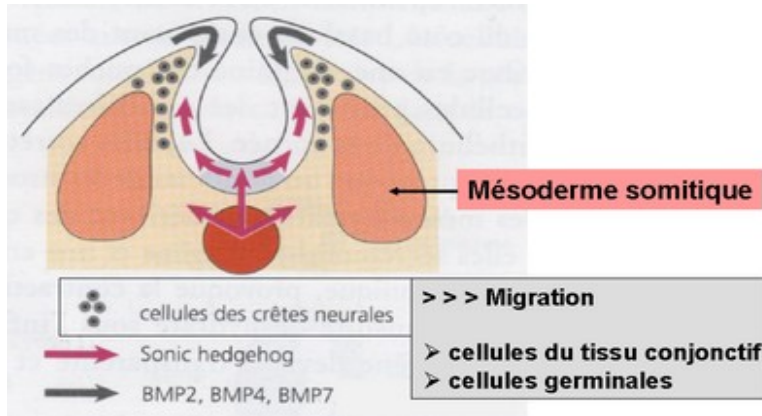
Les cellules de la chorde induisent les cellules au-dessus à changer de forme (cellules ectodermiques qui deviennent hautes) grâce à Chordin et Noggin notamment.

Expérience : incubation de Noggin ou (Chordin +FGF) avec calottes animales → apparition de marqueurs de différenciation neurale (neurectoderme).

Antagonisme d'action de BMP4 qui permet le développement de l'ectoderme. Le neurectoderme se développe au dépens du neurectoderme.

Chordin, Noggin et FGF permettent la différenciation neurale.

Fermeture du tube neural :



Il y a sécrétion d'une protéine, Sonic Hedgehog (Shh), dont l'expression augmente au cours de la neurulation. Il y a un maintien de la polarité dorso-ventrale grâce à ce facteur.

Il y a en même temps une action antagoniste des BMP : BMP4, BMP2 et BMP7 autour du tube neural, seule une portion longiligne au-dessus de la corde subit l'influence de Shh.

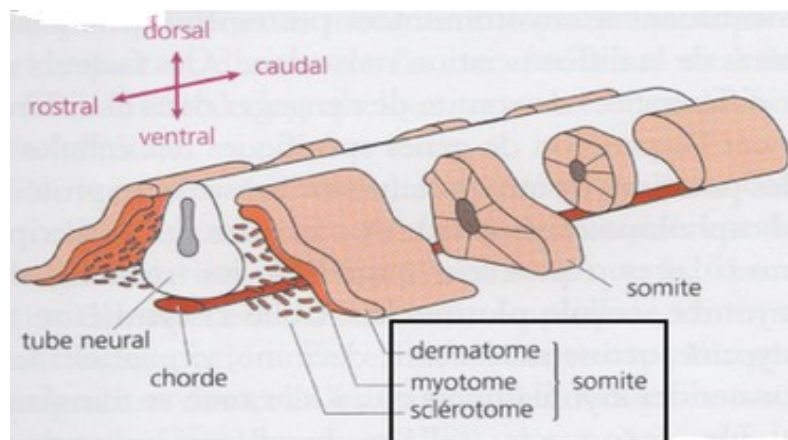
Le mésoderme somitique, quant à lui, est de part et d'autre du tube neural.

Le long de l'axe antéro-postérieur, le mésoderme somitique donne les dérivés suivants :

- tissu conjonctif
- os
- cartilage
- derme
- muscles

On va s'intéresser plus particulièrement à la formation des muscles.

Les somites : description.



Formation des somites A > P

Chaque somite est une entité structurale autonome

Dermatome > derme

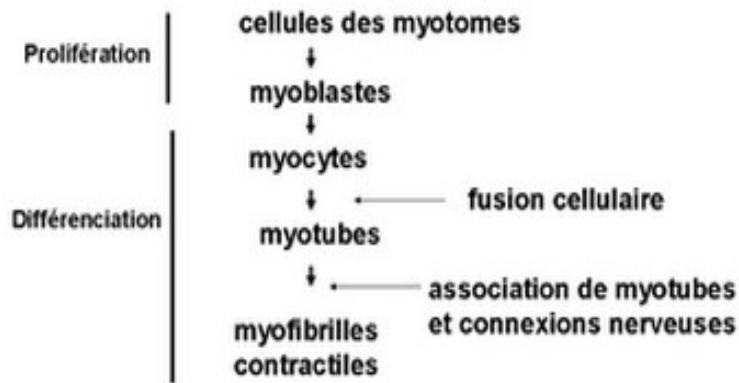
Myotome > cellules musculaires

Sclérotome > cellules à l'origine des vertèbres

Les somites se différencient d'abord au niveau céphalique.

2. Le développement des muscles squelettiques :

Pour tous les tissus c'est toujours la même séquence : phase de prolifération, suivie d'une phase de différenciation.



Myotubes : cellules multinucléées incapables de se diviser.

Le muscle cardiaque est composé de cellules différentes des cellules musculaires motrices.

La formation des muscles est un phénomène original de différenciation du fait de la fusion cellulaire qui est un mécanisme rare.

Quels sont les signaux proliférateurs?

Le FGF stimule la prolifération des myoblastes : FGF → réplication d'ADN +++ dans les myoblastes, d'où une multiplication cellulaire par mitoses.

Entrée des myoblastes en différenciation : disparition des récepteurs au FGF → arrêt des multiplications.

Stratégie : montrer que le facteur de croissance est capable de favoriser la croissance des cellules musculaires.

Exemple de FGF6 (fibroblast growth factor 6).

Expérience : étudier l'effet de FGF6 sur la lignée cellulaire musculaire C2C12 (qui ne l'exprime pas normalement).

On fait s'exprimer FGF6 dans la lignée en transfectant (= en introduisant dans les cellules) le gène codant pour FGF6.

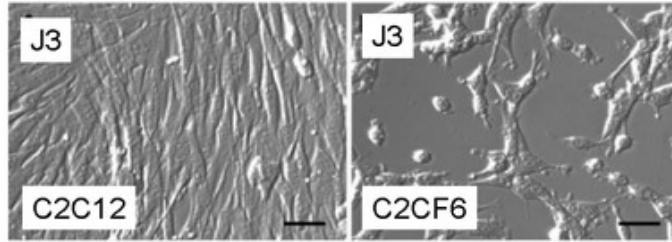
Résultat : on obtient une nouvelle lignée cellulaire, C2CF6.

On vérifie que les cellules de la lignée C2CF6 produisent bien du FGF6 par mesure de FGF6 dans le milieu de culture des cellules (Western Blot).

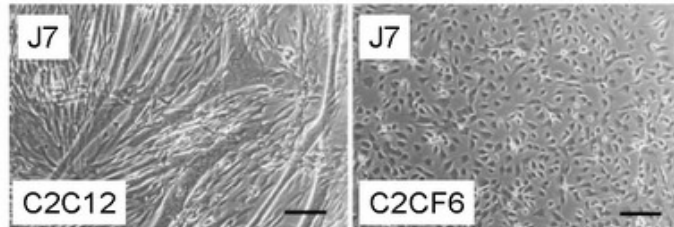


Il y a bien une production massive de FGF6.

Analyse morphologique des cellules :



Interprétation: Quand FGF6 est synthétisé, la prolifération se poursuit.
Pas de différenciation.



en différenciation
 rassemblement, fusion cellulaire

 grande multiplication
 pas de phénomènes de rassemblement ni de fusion

Action de FGF6 :

Un des effets de FGF6 est de stimuler la synthèse de MDR1 (MultiDrug Resistance Protein 1).

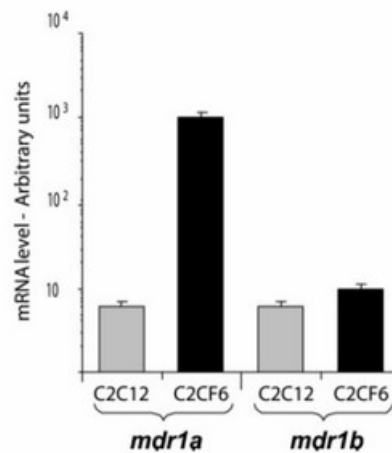
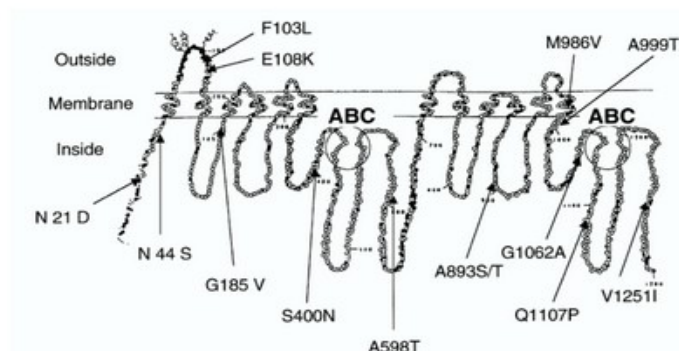


Fig. 9. *mdr1* up regulation in FGF6-expressing C2C12. A: Quantitative real-time RT-PCR analysis of *mdr1a* mRNAs in parental C2C12 and FGF6-expressing C2C12 cells (n=3). Values were normalized according to TFIID levels.

Il stimule en particulier MDR1a qui est un récepteur.

MDR1 est un transporteur de la famille ABC (ATP-Binding Cassette)

Protéine membranaire de 1280 aa
Hydrolyse l'ATP et régule l'entrée de molécules dans la cellule



La famille ABC est une famille de protéines à structure très spécifique avec plusieurs insertions dans la membrane.

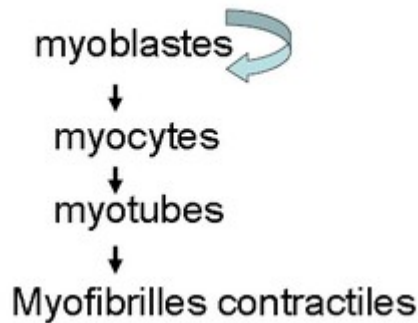
Le rôle physiologique de MDR1 n'est pas clairement identifié.

Hypothèse : la protéine membranaire pourrait protéger les cellules de l'apoptose (mort cellulaire programmée).

Conséquence : il y aurait ainsi un maintien de la prolifération des cellules.

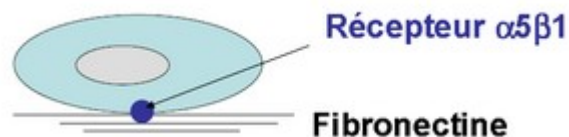
3. Les marqueurs de la différenciation musculaire.

Le cycle de formation des cellules musculaires :



Le fonctionnement est identique chez l'embryon et chez l'adulte. Cependant, il n'apparaît qu'en cas de lésions pour l'adulte.

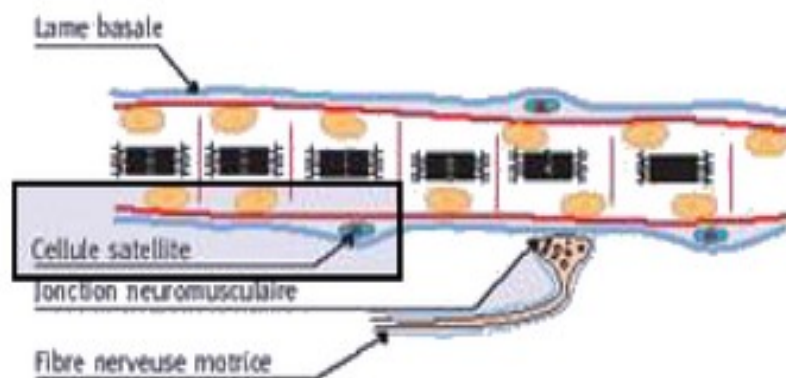
La matrice extracellulaire joue un rôle essentiel dans la différenciation. En effet, les myoblastes en différenciation sécrètent de la fibronectine, et s'y lient grâce à un récepteur intégrine : $\alpha 5\beta 1$.



Cette liaison est indispensable à la différenciation des myoblastes. Si on empêche la liaison à la fibronectine (ajout d'inhibiteurs), il n'y a plus de différenciation des myoblastes en myocytes.

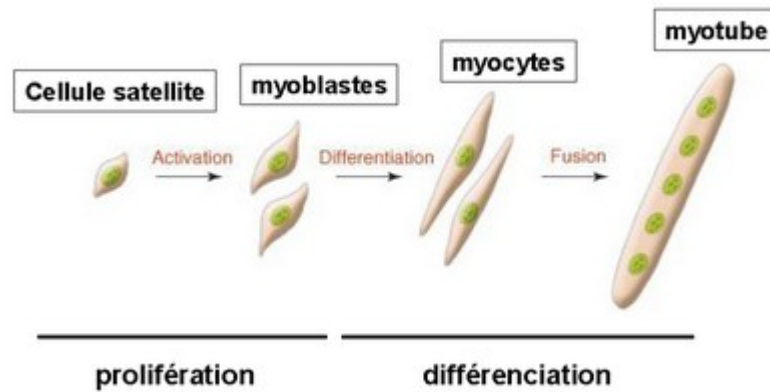
Le renouvellement chez l'adulte :

En cas d'altération, ou lors du vieillissement, des mécanismes presque identiques de ceux du développement embryonnaire ont lieu chez l'adulte et permettent le renouvellement.



A la périphérie des muscles, on trouve des cellules non différenciées, capables de proliférer puis de se différencier : les cellules satellites. Elles se situent sous la lame basale, accolées aux myofibrilles.

Reformation de myofibrilles musculaires :

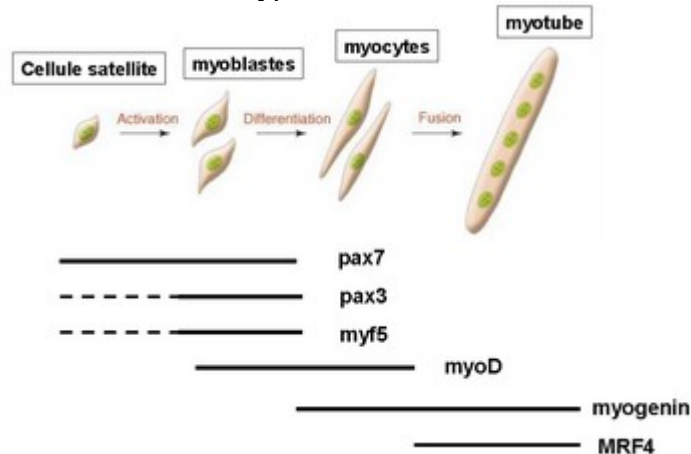


Les cellules satellites et les myoblastes peuvent proliférer à l'inverse des cellules suivantes. Il y a une hétérogénéité de la taille des cellules.

Après fusion cellulaire, il y a plusieurs noyaux par cellules (stade de myotubes)

On note une absence de centriole dans les myotubes, une réorganisation du matériel péricentriolaire au tour des noyaux (toujours des microtubules autour des noyaux).

Caractérisation moléculaire des différents types de cellules musculaires :



Il y a une expression séquentielle des facteurs de transcription.

Pax3 et myf5 sont très peu exprimés dans les cellules satellites, mais beaucoup dans les myoblastes.

MyoD est caractéristique des myoblastes et des myocytes.

La myogénine est exprimée dans tous les types cellulaires différenciés (myocytes, myotubes, myofibrilles). MRF4 s'exprime seulement dans les myotubes.

→ Il y a donc une **expression séquentielle des facteurs de transcription**.

Pax7 semble être le premier exprimé.

Puis pax3, myf5 et myoD apparaissent (pax7 est toujours exprimé).

Puis myogénine et MRF4 (et disparition des facteurs de différenciation précoces).

Il y a **expression de gènes spécifiques** des cellules musculaires.

– des protéines de structure :

actine musculaire

autres protéines contractiles (myosine,...)

protéines des filaments intermédiaires (desmine, vimentine,...)

– des enzymes

« exemple : des créatines phosphokinases spécifiques.

Les marqueurs musculaires de différenciation (suite) !

TABLE 1. Markers for Axial Body Muscle Differentiation

| Probe | Stage of onset | Comment | Reference |
|-----------------|----------------|--|------------------------------------|
| XMyf6 | Stage 9.5 | | Hopwood et al., 1991 |
| XMyoD | Stage 10.5 | | Hopwood et al., 1989; Harvey, 1991 |
| XMRF4 | Stage 18 | | Jennings, 1992 |
| XMyogenin | Stage 52 | Secondary myogenesis | Nicolas et al., 1998 |
| Cardiac actin | Stage 10.5 | | Mohun et al., 1988, 1994 |
| Skeletal actin | Stage 10.5 | | Mohun et al., 1988, 1994 |
| Femoral actin | Stage 11 | | Mohun et al., 1988, 1994 |
| MHC E3 | Stage 21 | Primary myogenesis | Rodice and Malacinski, 1989 |
| MHC E19 | Stage 21 | Primary myogenesis | Nicolas et al., 1998 |
| MHC A7 | Stage 52 | Secondary myogenesis | Rodice and Malacinski, 1989 |
| MLC 1I/3I | Stage 12 | | Nicolas et al., 1998 |
| TM α 2 | Stage 15 | Striated and cardiac muscles | Thze et al., 1995 |
| TM α 7 | Stage 15 | Primary myogenesis | Hardy et al., 1999 |
| β -TM emb | Stage 25 | Primary myogenesis (from stage 25 to 42) | Hardy et al., 1999 |
| β -TM ad | Stage 42 | Secondary myogenesis | This study |

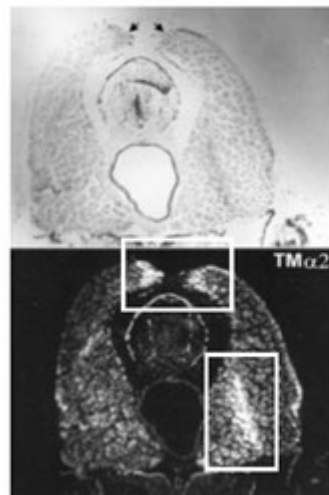
tropomyosine

Plusieurs gènes codant pour des actines de fonction spécifique

Les actines de fonction spécifique sont les actines musculaires.

Le gène de la tropomyosine et son expression sont très importants. La tropomyosine est un marqueur de différenciation musculaire au niveau des somites.

Expression d'une protéine cytoplasmique spécifique : la tropomyosine



La tropomyosine, un marqueur de différenciation musculaire (coupes de bourgeon caudal, stade 54)

Hybridation in situ (localisation de l'ARNm)

On a une localisation de la tropomyosine au niveau supérieur et au niveau intermédiaire des somites.

Rôle de pax7 :

Analyse de souris mutées homozygotes pour le gène de pax7. Ces souris ont donc deux allèles non fonctionnels pour pax7 (=pax7 $-/-$).

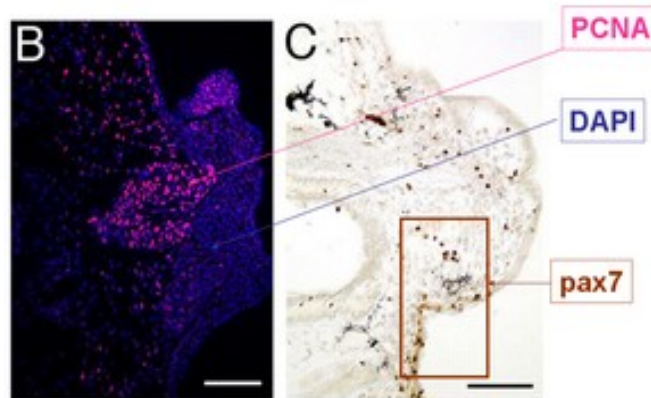
Le nombre de cellules satellites décroît rapidement après la naissance chez les souris mutantes pax7 $-/-$.

La régénération du muscle est déficiente chez les souris adultes pax7 $-/-$.

Les organismes pax7 $-/-$ sont donc viables, mais les conséquences sont graves en cas de lésions musculaires car la régénération du muscle est déficiente, donc il y a une atrophie musculaire suite aux lésions.

Par ailleurs, pax7 est exprimé très précocement au cours de la régénération chez l'amphibien. La régénération est la repousse d'un membre arraché ; c'est un phénomène spécifique des

amphibiens, n'existant pas chez les mammifères.



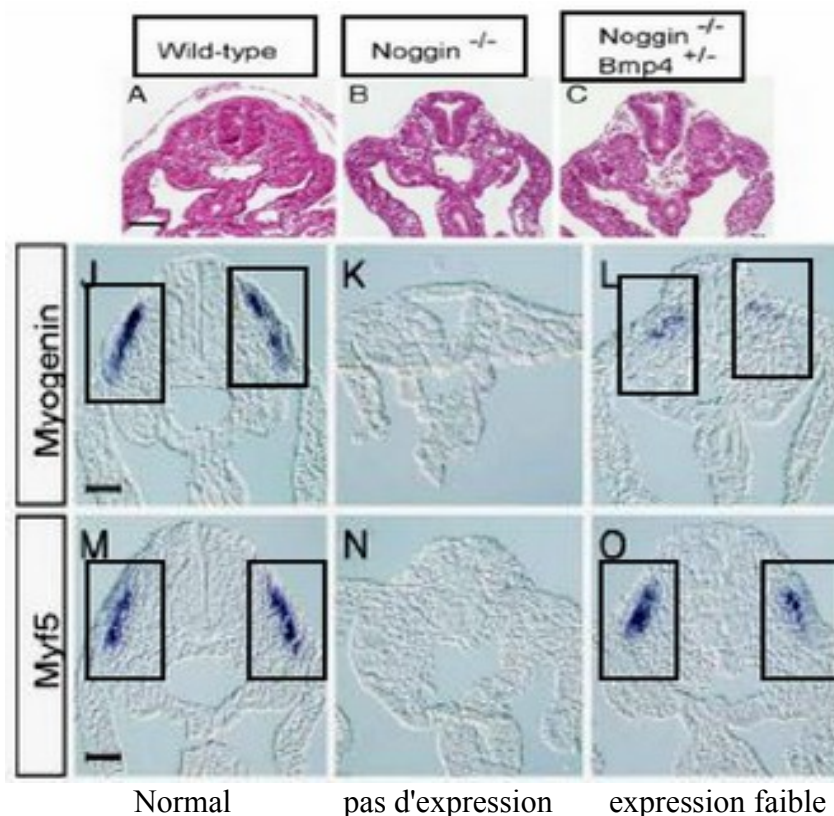
Localisation par différentes techniques, notamment hybridation in situ.

Myogénine et myf5 :

L'expression de ces 2 marqueurs de différenciation est étudiée chez des souris transgéniques.

L'expression de myogénine et de myf5 dépend d'une signalisation noggin.

On compare des souris sauvages (noggin^{+/+}), des souris mutantes noggin^{-/-} et des souris mutantes noggin^{-/-} et possédant une seule copie du gène BMP4 (BMP4^{+/-}).



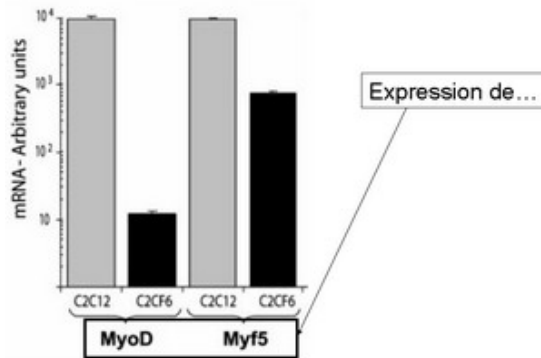
Conclusion :

Il y a une localisation précoce au niveau des somites de myf5 et myogénine.

En absence de noggin, il n'y a pas d'expression de facteurs de transcription spécifiques de la différenciation musculaire.

Dans les « double mutants » (absence de noggin et présence partielle de BMP4) : on a une expression de myf5 et une présence faible de myogénine. Cela s'explique par le fait que, chez ces souris, on a 50% de BMP4 sécrété en moins, donc 50% d'antagoniste de noggin en moins.

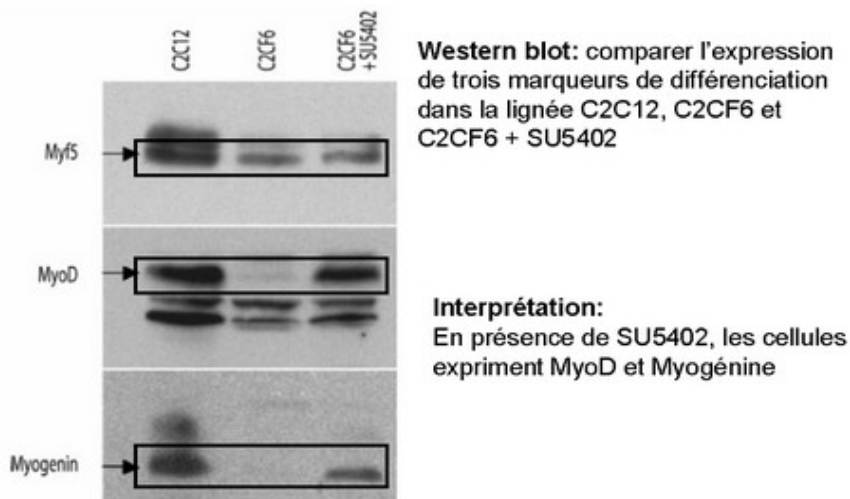
Retour aux lignées cellulaires :



Les marqueurs de différenciation : les ARNm de MyoD et myf5 sont faiblement exprimés dans les cellules C2CF6 comparativement aux cellules C2C12. Normal, ce sont des cellules en prolifération, donc peu différenciées!

Expérience :

Incubation de cellules C2CF6 avec un inhibiteur de FGF6 (SU5402).

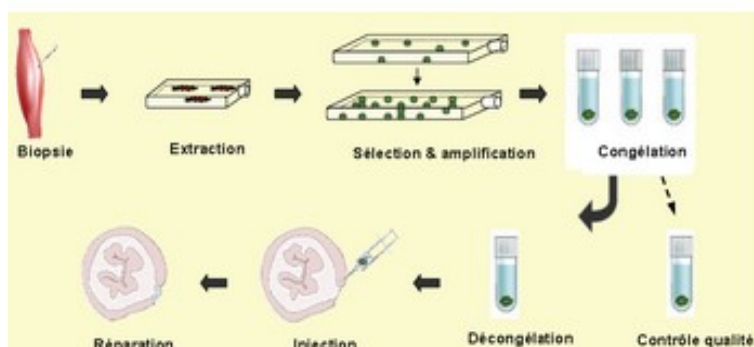


Si on bloque les signaux de prolifération (ici le FGF6), on a un retour à la différenciation. De plus, l'observation des cellules de la lignée C2CF6 + SU5402 montre la présence de myotubes.

Conclusion : on a une corrélation in vitro entre l'expression de MyoD et myogénine et la différenciation tissulaire.

Applications :

Réparation de muscles déficients chez l'adulte (thérapie cellulaire régénérative)



Ces techniques ouvrent la voie à une médecine cellulaire, dont les avantages sont :

- la spécificité (cellules de l'individu par ex*
- l'absence de toxicité (pas d'effets secondaires si les cellules sont bien compatibles)*

Elles étendent également le champ d'exploration aux cellules souches adultes, voire embryonnaires...mais problèmes éthiques.