

II La fécondation

La fécondation correspond à la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovocyte pour former une cellule souche diploïde et totipotente, qui sera à l'origine de tous les tissus du futur individu. Lors de ce phénomène, l'œuf est activé pour commencer son programme de développement, et les noyaux des 2 gamètes fusionnent pour former le génome du nouvel individu.

Pour que la fécondation ait lieu, il va y avoir 2 événements préalables qui vont être :

- la transformation du spermatozoïde afin de le rendre capable de reconnaître l'ovocyte et de s'y fixer : c'est le phénomène de capacitation qui intervient notamment dans le changement de mobilité du spermatozoïde.
- La deuxième étape nécessaire est la réaction acrosomique, c'est à dire la fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide de l'ovocyte et l'exocytose du contenu de l'acrosome pour permettre le passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide.

Deux autres étapes constituent la fécondation proprement dite :

- d'une part l'attachement des membranes des 2 gamètes et leur fusion, ce qui va permettre au spermatozoïde et à son information génétique de rentrer dans l'ovocyte.
- D'autre part l'activation de l'œuf, qui se traduit par la mise en marche du premier cycle cellulaire du zygote et s'achèvera par la première division de segmentation.

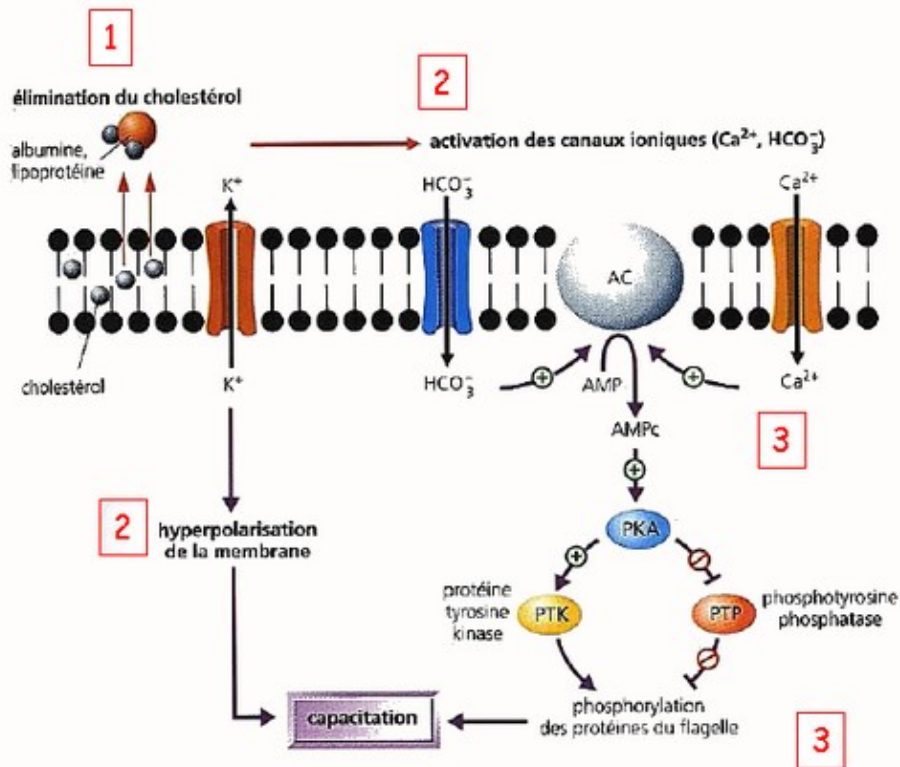
A) la capacitation

À la sortie des voies génitales mâles, les spermatozoïdes sont potentiellement fécondants, ce qu'ils n'étaient pas à la sortie du tube séminifère, mais ils ne sont pas encore capables de féconder l'ovocyte. Ils possèdent une mobilité réduite. Ils acquièrent le pouvoir fécondant via leur passage dans l'épididyme et par les sécrétions annexes. Il y a activation des récepteurs capables de reconnaître l'ovocyte, mais ceux-ci sont protégés pour tout le transit dans les voies génitales mâles et le début des voies génitales femelles.

La capacitation a lieu dans les voies génitales femelles sous l'action des sécrétions du tractus génital féminin qui contient notamment différentes enzymes protéolytiques. La première étape de la capacitation est l'élimination du plasma séminal et des sécrétions des glandes mâles annexes. Ensuite, l'acidité de plus en plus forte du tractus génital féminin, autour de 6,5 dans le liquide utérin, va contribuer au détachement des protéines qui masquent les récepteurs à la zone pellucide qui ont été ajoutées dans l'épididyme. Après élimination de liquide séminal et des systèmes de protection des récepteurs, d'autres étapes ont lieu qui vont entraîner des modifications de la membrane plasmique des spermatozoïdes et des modifications de leur mobilité. D'abord, il y a élimination du cholestérol inséré dans la bicouche lipidique de la membrane des spermatozoïdes. Le cholestérol va être fixé par les lipoprotéines présentes dans les sécrétions femelles et également par l'albumine qui peut le capter. Ce retrait du cholestérol va modifier la fluidité membranaire et donc la structure de la membrane, ce qui va provoquer l'ouverture de canaux ioniques, dont les canaux calciques, et bicarbonates HCO_3^- (et aussi potassium). L'entrée de calcium et de bicarbonates entraîne une hyperpolarisation membranaire et également une augmentation du calcium intracellulaire, qui, en activant la PKA, va provoquer des phosphorylations, notamment de protéines du flagelle, ce qui augmente la mobilité du spermatozoïde nécessaire pour féconder l'ovocyte. Outre, ces effets, ces remaniements membranaires vont entraîner l'exposition de récepteurs fonctionnels qui pourront assurer la fixation à la zone pellucide de l'ovocyte ; un changement de conformation des glycoprotéines permet leur exposition.

La capacitation est un phénomène progressif, et tous les spermatozoïdes ne sont pas capables au même niveau de l'appareil génital féminin ; la capacitation a lieu jusque dans les trompes. Toutes ces étapes s'effectuent physiologiquement dans les voies génitales femelles, mais elles peuvent aussi se faire en laboratoire pour les techniques de PMA (fécondation in vitro). Il faut quelques heures pour réaliser une capacitation chez l'homme.

Les différentes étapes de la capacitation



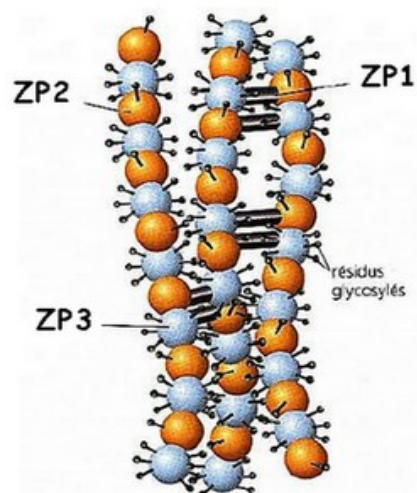
B) De la reconnaissance des gamètes à la fusion des membranes

1. la zone pellucide et les récepteurs spermatiques.

Il y a besoin de récepteurs sur les deux gamètes pour permettre la reconnaissance, et donc la fécondation.

L'ovocyte est entouré de la membrane pellucide qui est une enveloppe glycoprotéique d'environ $7\mu\text{m}$ qui résulte de la sécrétion à la fois de l'ovocyte et des cellule de la corona radiata.

Représentation schématique de la composition moléculaire de la zone pellucide



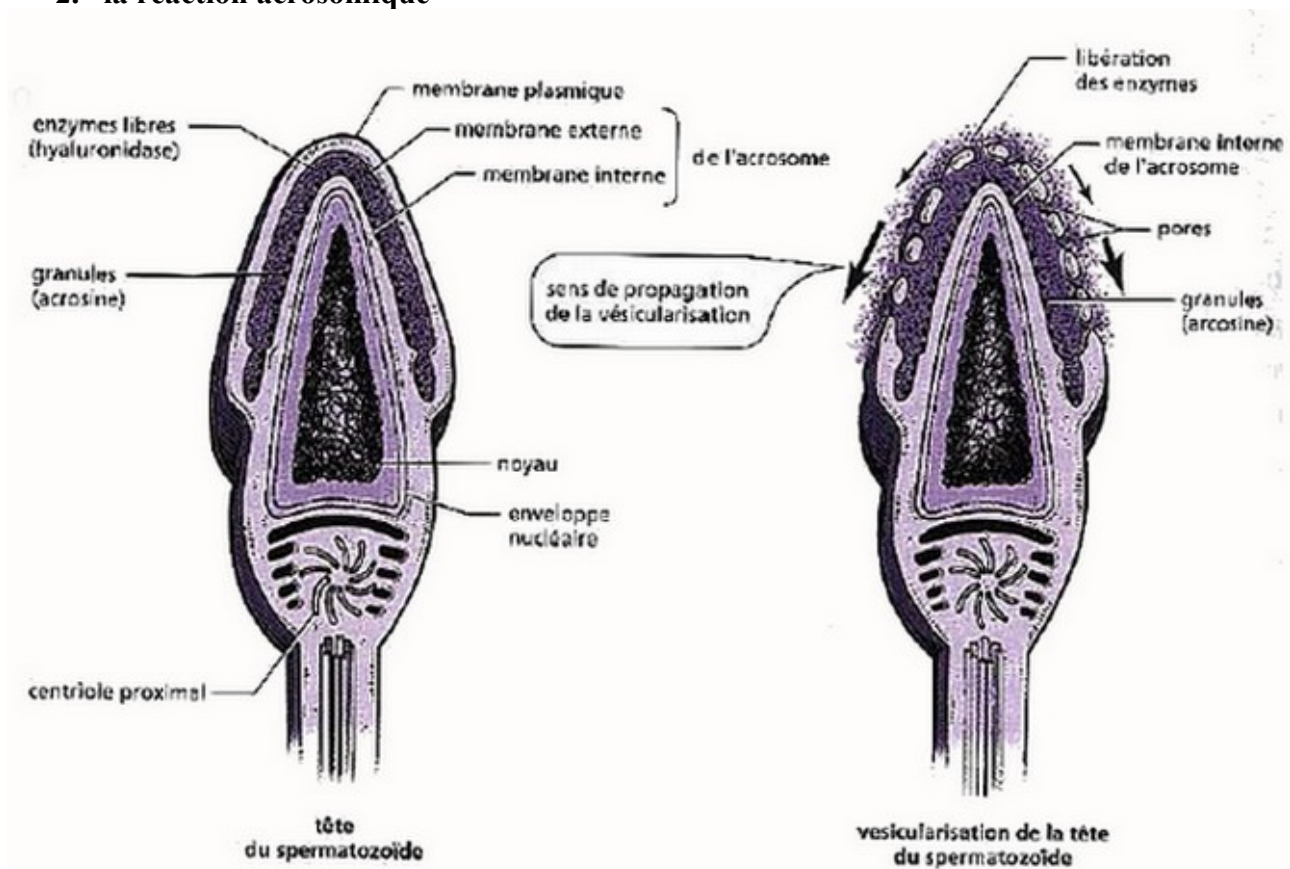
Cette zone est constituée par un complexe macromoléculaire composé de 3 glycoprotéines : ZP1, ZP2 et ZP3. Ces glycoprotéines sont fortement glycosylées. La glycoprotéine ZP2 s'associe linéairement avec ZP3 pour former un polymère fibrillaire (liaisons covalentes), et ces fibrilles vont être complexées entre elles de façon non covalente par des dimères de ZP1. Différentes expériences ont montré que c'est spécifiquement la glycoprotéine ZP3 qui est responsable de la liaison entre l'ovocyte et le spermatozoïde.

Il y a beaucoup d'études menées pour comprendre quels étaient les récepteurs spermatiques impliqués dans l'attachement à l'ovocyte, c'est à dire la reconnaissance et la liaison. Un certain nombre de récepteurs spermatiques ont été mis en évidence sur la membrane du spermatozoïde et seraient responsables de l'interaction avec ZP3. Il existe de nombreux récepteurs spermatiques impliqués dans la reconnaissance de la zone pellucide :

- # PH 20 : cobaye
- # β 1,4 galactosyltransférase : souris (homologue du D-mannosidase humain)
- # ZRK (zona receptor kinase) : souris
- # Sp 56 : souris
- # D-mannosidase : homme
- # SOB 3 : homme

Il y a un phénomène de redondance des récepteurs spermatiques à la zone pellucide (plusieurs récepteurs différents), ce qui permet une compensation en cas de défaut d'un récepteur. Une fois que le spermatozoïde se fixe à la zone pellucide, il va y avoir le processus de réaction acrosomique.

2. la réaction acrosomique

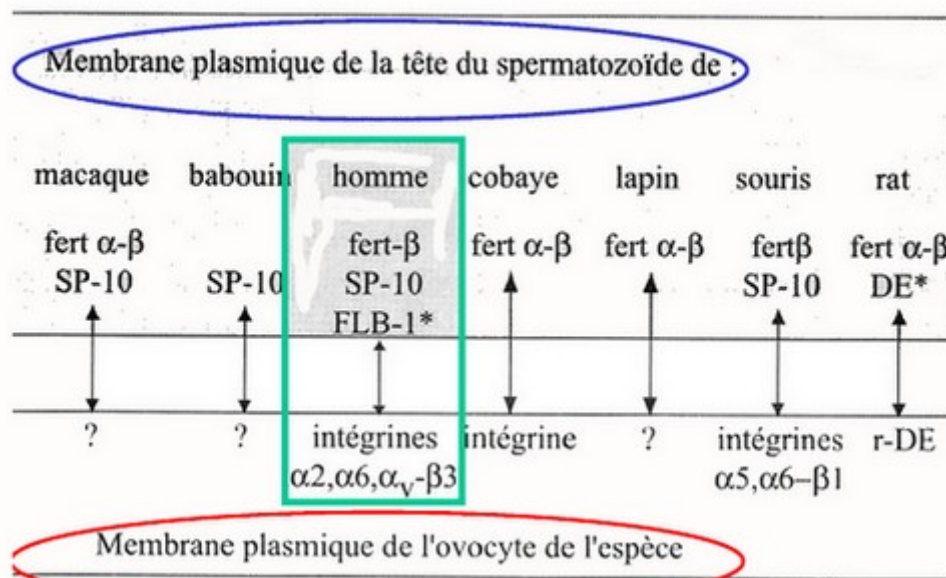


Il y a 2 membranes au niveau de l'acrosome : une interne et une externe. La membrane externe se trouve juste sous la membrane plasmique du spermatozoïde et porte les récepteurs spermatiques à la zone pellucide et plus particulièrement à ZP3 ; la membrane acrosomique interne est juste au-dessus du noyau. La fixation à ZP3 va déclencher la fusion de la membrane plasmique et de la membrane

externe de l'acrosome qui est à son contact. Cette fusion va entraîner la formation de petites vésicules espacées par les pores qui permettent la libération du contenu de l'acrosome au contact de la zone pellucide. Ce phénomène s'effectue d'abord à l'apex des spermatozoïdes, puis va progresser de part et d'autre du point de fusion, vers la pièce intermédiaire du spermatozoïde. La formation de ces vésicules va percer la membrane et libérer les enzymes acrosomiales comme l'acrosine et la hyaluronidase qui permettent la rupture des pontages entre ZP1 et ZP2-ZP3, et contribuent au franchissement de la zone pellucide. Après la réaction acrosomique, il va y avoir une deuxième fixation du spermatozoïde, cette fois-ci à la glycoprotéine ZP2 de la zone pellucide, de façon à ce que le spermatozoïde ne ressorte pas. Il y a ancrage du spermatozoïde par des récepteurs de la membrane interne de l'acrosome, une fois que la membrane plasmique a disparu. Cette réaction est déclenchée par l'augmentation du calcium intracellulaire, probablement via l'activation de voies de signalisation faisant suite à la fixation à ZP3 des récepteurs de la tête du spermatozoïde.

3. reconnaissance et fusion des membranes

Une fois que le spermatozoïde a reconnu la zone pellucide et l'a traversée, il faut qu'il y ait une première reconnaissance entre les membranes plasmiques des deux gamètes. Il y a eu interaction entre la zone pellucide et la membrane du spermatozoïde qui a disparu. C'est la membrane interne de l'acrosome qui doit reconnaître la membrane plasmique de l'ovocyte, et une fois la reconnaissance faite, il doit y avoir fusion entre les membranes plasmiques des gamètes. L'adhésion des 2 gamètes fait intervenir des molécules d'adhérence spécifiques de la surface de chaque gamète. Les protéines impliquées possèdent deux domaines d'activité : un domaine qui va servir à la fixation et un domaine qui va permettre la fusion et qui possède un site protéase. Ces protéines spécifiques des gamètes sont les intégrines pour l'ovocyte et les fertilines pour les spermatozoïdes. Ces deux types de protéines appartiennent à une famille plus générale impliquées dans l'adhésion et la fusion, la famille ADAM (A Disintegrin and Métalloproteases domaine).



chez l'homme : la fertiline β , SP-10, FLB1 \rightarrow membrane interne de l'acrosome
 # chez la femme : les intégrines $\alpha 2 \beta 3$, $\alpha V \beta 3$, et $\alpha 6 \beta 3$ \rightarrow membrane de l'ovocyte.
 Les intégrines sont des hétérodimères avec une sous unité α et une sous unité β .

Il y a interaction entre ces protéines puis fusion des membranes plasmiques. Lors de la fusion, des études réalisées au ME ont montré que le spermatozoïde se place tangentiellement à la membrane de l'ovocyte et que la fusion va débiter au niveau de la région moyenne de la tête du spermatozoïde et va se poursuivre de part et d'autre de cette région. Après la fusion des membranes, la tête du

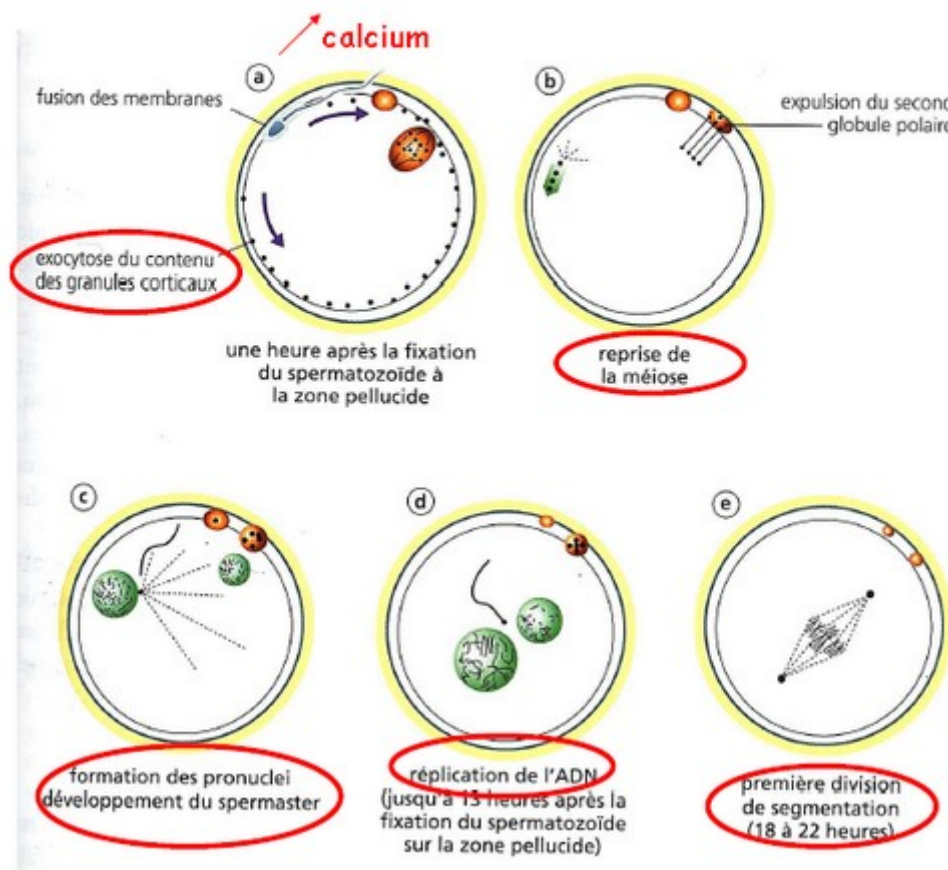
spermatozoïde ainsi que la pièce intermédiaire et une partie du flagelle sont incorporés au cytoplasme de l'œuf. La pièce intermédiaire va contribuer à l'apport paternel du centrosome.

C) la fusion des noyaux et l'activation de l'œuf

La tête, la pièce intermédiaire et une part du flagelle se retrouvent dans l'œuf. La pièce intermédiaire apporte le centriole qui va permettre la fin de la méiose maternelle. On pense que la fusion des gamètes est comparable à celle d'un virus avec sa cellule-cible. La fusion des membranes et l'entrée du spermatozoïde vont être suivies d'une activation des voies de signalisation qui vont entraîner une augmentation du calcium intracellulaire, ce phénomène faisant intervenir une cascade. Cette augmentation du taux de calcium va être suivie de différents évènements :

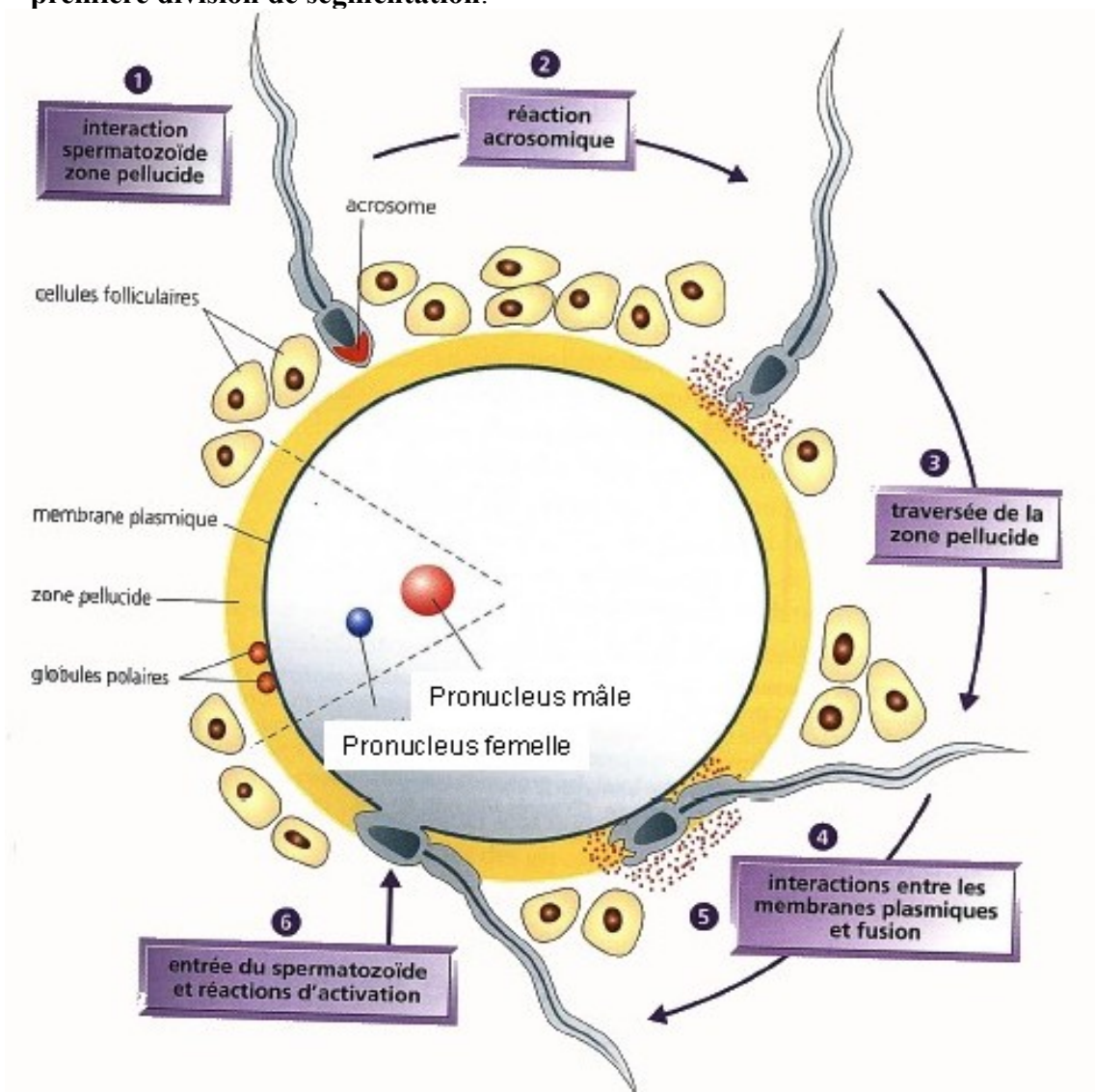
- d'une part l'**exocytose du contenu des granules corticaux** situés sous la membrane plasmique de l'œuf. Les substances libérées, des enzymes, vont modifier la zone pellucide pour la rendre imperméable aux spermatozoïdes. Ceci constitue la première barrière contre la polyspermie qui se met en place très vite, c'est la membrane de fécondation.
- L'exocytose des granules corticaux a pour effet secondaire de créer un **espace périvitellin** qui est la deuxième barrière à la polyspermie, l'espace trop grand empêchant les spermatozoïdes d'atteindre la membrane de l'ovocyte.

Représentation schématique des réactions d'activation de l'œuf des Mammifères



Ces phénomènes sont suivis d'une activation nucléaire qui va comprendre 4 étapes :

- la **reprise et l'achèvement de la méiose de l'ovocyte**, probablement grâce à l'augmentation du calcium qui va entraîner la dégradation de facteurs qui bloquaient l'ovocyte en métaphase II (CSF). La méiose s'achève avec l'expulsion du deuxième globule polaire.
- Il y a ensuite la **formation des pronucléi mâle et femelle**. Chaque pronucléus comprend n chromosomes à 1 chromatide, dans une enveloppe nucléaire différenciée.
- En parallèle **se forme le spermaster**, qui est un réseau de microtubules formé grâce au centriole apporté par la pièce intermédiaire du spermatozoïde. Il permet le rapprochement des pronucléi.
- Ensuite dans les pronucléi se déroule une **réplication d'ADN**, quelques heures après la formation des pronucléi. Cette réplication va se faire de façon indépendante dans chacun des pronucléi, plus de 10h après la fécondation.
- Le spermaster pendant ce temps, rapproche les pronucléi vers le centre de l'œuf, les membranes nucléaires vont interagir avant de disparaître. C'est la **caryogamie**. Les noyaux interagissent par des interdigitations.
- Les chromatides se condensent pour former des chromosomes bichromatidiens, le centriole se réplique et le faisceau mitotique se met en place. Les chromosomes s'assemblent sur le fuseau, appelé plaque métaphasique, mais sans se mélanger. La fécondation s'achève par la **première division de segmentation**.



III Les premières étapes du développement.

Quelle que soit l'espèce, les premières étapes du développement reposent sur les mêmes phénomènes : activation proliférative, migration (déplacement), communication, différenciation, qui sont des activités fondamentales.

Toutes les activités cellulaires sont coordonnées dans l'espace et dans le temps de façon extrêmement précise et sont sous le contrôle de gènes du développement.

Après la fécondation, on distingue 4 grandes étapes :

- la **segmentation**, qui transforme l'œuf en une structure pluricellulaire composée de blastomères, sans modification sensible du volume global.
- La **gastrulation**, qui correspond à la mise en place des 3 feuilletts embryologique primordiaux :
 - # l'ectoblaste (ou ectoderme) à l'origine de la peau et du système nerveux.
 - # le mésoblaste (ou mésoderme) à l'origine du squelette et des muscles.
 - # l'endoblaste (ou endoderme) à l'origine des viscères (systèmes digestif et cardio pulmonaire notamment)

- la **neurulation**, qui permet la mise en place du plan d'organisation primaire, avec l'allongement selon l'axe antéro-postérieur; l'aplatissement selon l'axe dorso-ventral, et la mise en place de l'ébauche du système nerveux.
- L'**organogénèse**, c'est à dire la formation des organes à partir des feuilletts embryologiques précédemment mis en place, la différenciation tissulaire et le modelage de l'organisme de l'embryon. Il y a en parallèle une **morphogénèse** (modelage de l'aspect extérieur de l'embryon, vers un physique « humain »)

On parle d'embryon chez l'homme jusqu'à 8 semaines, avec les phase d'embryogénèse, d'organogénèse et de morphogénèse. On parle ensuite de fœtus, avec la poursuite de l'organogénèse à partir des ébauches embryologiques, la maturation des organes formés et le modelage de l'organisme de l'embryon.

*) La segmentation

Chez les Mammifères, le début du développement se déroule dans les trompes utérines. La fécondation a lieu à l'extrémité de la corne utérine, au niveau de l'ampoule (tiers externe de la trompe). Il y a ensuite une phase de migration jusqu'à la cavité utérine, car c'est dans la cavité qu'a lieu l'implantation (nidation). Cette phase correspond au développement très précoce du zygote, dit pré-implantatoire. Toutes ces étapes vont se traduire par une multiplication des cellules pour aboutir au moment de l'implantation au stade blastocyste.

On distingue **différents types d'œufs** (=zygotes) :

- œufs télolécithes : vitellus très abondant, taille de l'ordre du centimètre, ou plus. Chez les reptiles, les oiseaux et les poissons.
- œufs hétérolécithes : vitellus plus condensé et abondant au pôle végétatif (pôle inférieur de l'œuf), taille de l'ordre du millimètre. Chez les amphibiens.
- œufs oligolécithes : peu de vitellus, réparti de façon homogène dans l'œuf, taille de l'ordre de quelques centaines de micromètres. Chez les oursins.

l'œuf des Mammifères

C'est un œuf très pauvre en vitellus, dit alécithe, d'une taille d'environ 100µm.

l'œuf humain

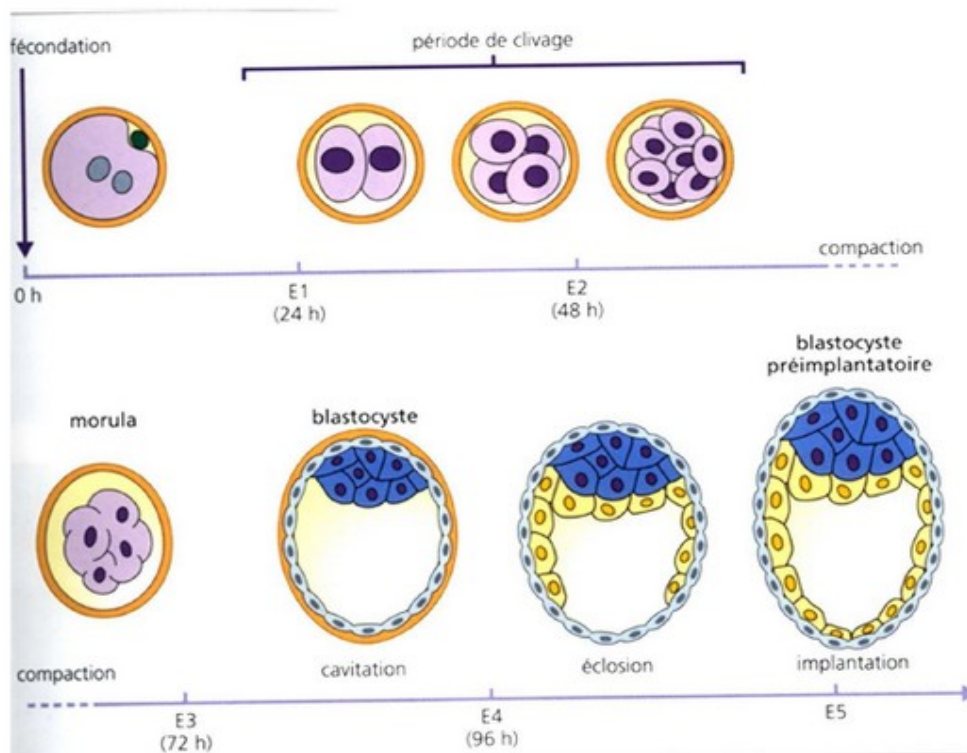
C'est une cellule à cytoplasme clair de 120 à 150 μm de diamètre, entourée de la zone pellucide. L'œuf humain est un œuf de mammifère, donc pauvre en vitellus, alécithe.

Il existe également **différents types de segmentation** de cet œuf :

- Segmentation holoblastique (totale) : cas de l'œuf humain.
- Segmentation méroblastique (partielle) : seule une région du cytoplasme se divise.

1. les premières divisions de l'œuf [étapes du développement chez la souris]

Les étapes du développement précoce chez la souris



a) la période de clivage

Chez la souris, 20 à 24h après la fécondation, l'œuf se divise en 2 cellules de taille identique : les blastomères, puis en 4, en 8,.... La deuxième division est asynchrone. Finalement, on aboutit à la formation, entre le 2^e et le 3^e jour, d'une structure qui possède un nombre déjà important de blastomères (8) et qui a l'apparence d'une petite mûre : la morula. Chez l'Homme, ce stade est atteint 4 jours après la fécondation.

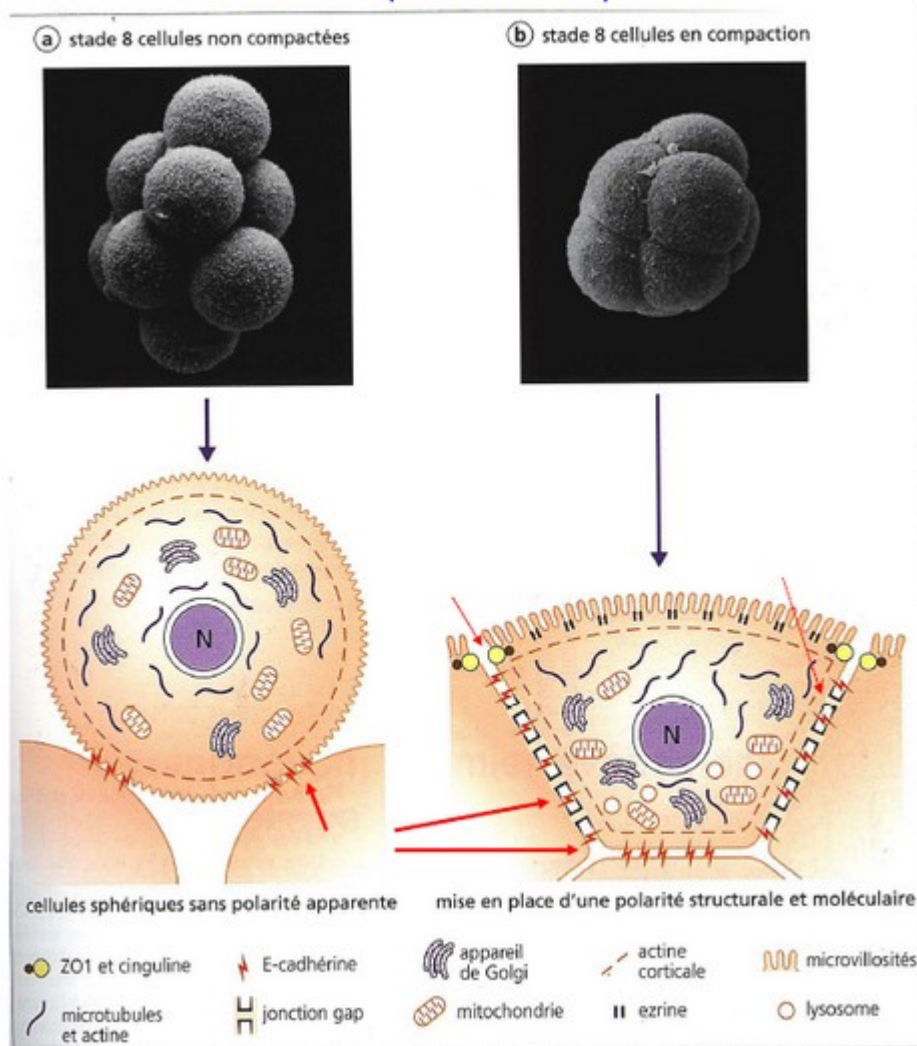
Jusqu'au stade 8 cellules, les blastomères sont sphériques, sans polarité apparente et présentent des microvillosités à leur surface afin de capter les nutriments. Des analyses biochimiques et immunohistochimiques ont montré la présence, entre ces différents blastomères, de molécules d'adhésion, notamment au niveau des contacts entre les cellules. Ces molécules sont des glycoprotéines appelées cadhérines qui permettent le contact entre les différents blastomères et leur cohésion.

b) la compaction

Au stade 8 cellules, l'œuf va s'engager dans une évolution morphologique et génétique (évolution

morphogénétique) appelée la compaction. Cette compaction est caractérisée par de profonds remaniements structuraux et moléculaires, et en particulier par la mise en place d'une polarité. Cette polarité sera à la fois structurale et moléculaire, l'expression moléculaire sera différentes au niveau basal et apical. L'œuf va s'aplatir, ce qui va entraîner une adhésion plus importante entre les blastomères. Cette adhésion est due à une accumulation de cadhérines et à une augmentation des surfaces de contacts entre les cellules. Pendant ce phénomène, au niveau apical, des jonctions serrées vont se mettre en place avec notamment l'insertion dans les membranes apicales de protéines spécifiques qui constituent la zonula occludens : protéine ZO1, cinguline. Au niveau latéral, des jonctions communicantes de type gap se mettent en place, ce qui permet le passage d'informations. La compaction aboutit au changement de forme des cellules et à la mise en place d'une polarité membranaire au stade 8 cellules.

La mise en place de la polarité



2. l'activation du génome

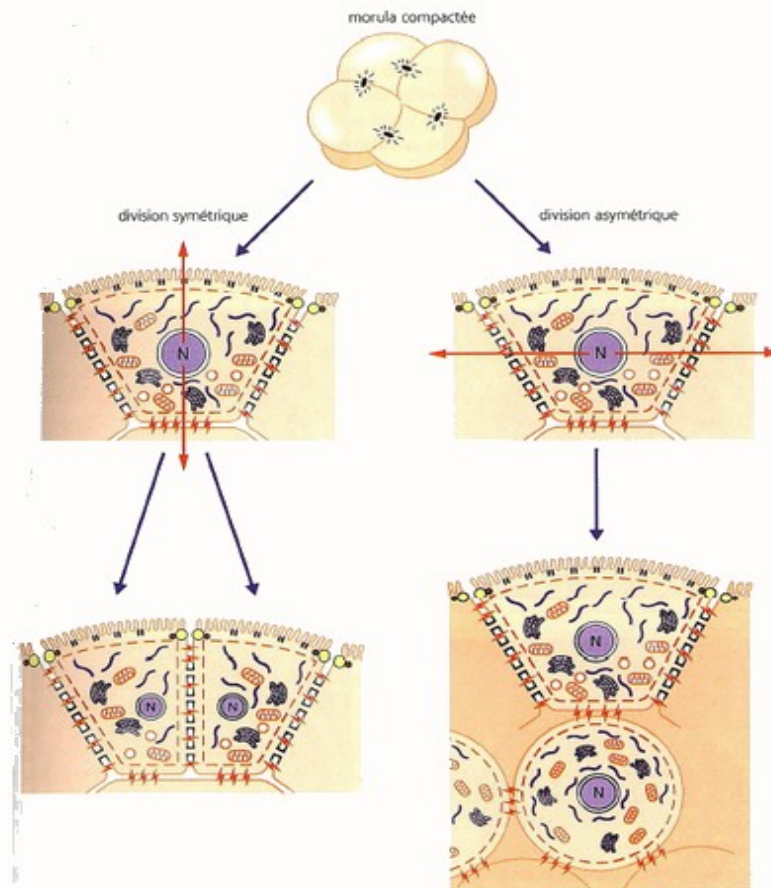
Il y a ensuite l'étape d'activation du génome. La segmentation est caractérisée par l'activation de la transcription du génome embryonnaire (=zygotique) et la dégradation progressive des ARN maternels et des protéines contenues dans l'œuf (réserves protéiques et d'ARN dégradés). Il y a en parallèle une mise en route de l'activité transcriptionnelle du génome embryonnaire. Chez la souris, jusqu'au stade 2 cellules, l'embryon utilise uniquement la machinerie de transcription et de traduction et les protéines stockées lors de l'ovogénèse. Ensuite, ce sont les gènes zygotiques qui vont être transcrits de plus en plus, et certains allèles, en fonction de leur origine paternelle ou maternelle, ne seront pas transcrits de la même façon, du fait probablement d'une méthylation

différente de l'ADN ; c'est un phénomène épigénétique.

Cette étape s'effectue chez l'humain au stade 8 cellules. En parallèle va se réaliser la ségrégation de 2 lignages cellulaires (ségrégation imposée).

3. la ségrégation de 2 lignages cellulaires

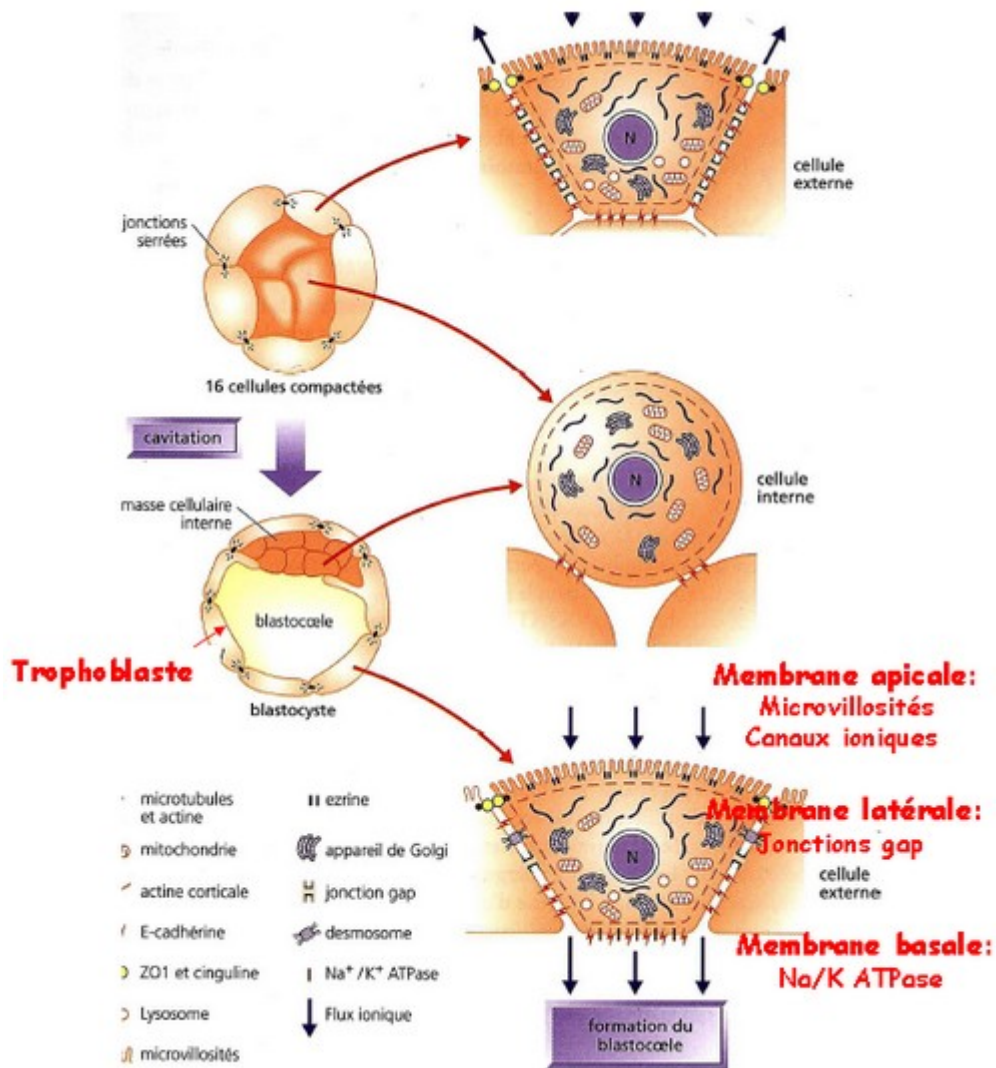
Les divisions symétriques et asymétriques



Après la compaction et l'activation du génome, les 8 cellules se divisent pour donner un embryon de 16 cellules, mais à ce stade les divisions deviennent symétriques ou asymétriques. De part la mise en place de ces 2 types de divisions, il y a formation de 2 lignages cellulaires. La ségrégation est déterminée par l'orientation du fuseau mitotique, et pour chacune des 8 cellules de la morula, l'orientation se fait au hasard. Si le fuseau de division est dans l'axe, la division sera symétrique et on obtiendra la formation de deux cellules externes. Si le fuseau est perpendiculaire à l'axe de la cellule, la division sera asymétrique et on aura la formation d'une cellule externe et d'une cellule interne. La cellule externe va hériter de la polarité membranaire et moléculaire, mais pas la cellule interne, on aura donc 2 lignages de cellules différentes avec des caractéristiques différentes. On définit un lignage cellulaire comme étant l'ensemble des modifications morphologiques, fonctionnelles et temporelles qui affectent une cellule et sa descendance et qui conduisent à la formation d'un clone de cellules d'un tissu ou d'un organe.

Les cellules externes vont participer à l'édification des annexes embryonnaires et vont former le lignage extraembryonnaire. Les cellules internes vont former le lignage embryonnaire et vont représenter les cellules progénitrices de l'embryon. Lors du passage de 16 à 32 cellules, il y a une régulation interne des divisions symétriques et asymétriques de façon à garder un équilibre entre les deux. Après cette ségrégation des 2 lignages commence l'étape de cavitation.

4. la cavitation



Cette étape, qui a lieu à partir du stade 16 cellules compactées, s'effectue entre le 3^e et le 4^e jour chez la souris. L'œuf va se creuser d'une cavité appelée blastocèle. C'est un phénomène dynamique, contrôlé par les cellules externes. Au niveau des cellules externes, on distingue une membrane apicale, qui présente des microvillosités, des canaux ioniques et des cotransporteurs nombreux, une membrane latérale caractérisée par de nombreuses jonctions communicantes de type gap et une membrane basale qui va acquérir une enzyme particulière : la Na/K ATPase. L'activation de cette enzyme va établir un gradient de concentration de Na⁺ et un courant de Na⁺. Ces mouvements d'ions vont créer une différence de pression osmotique qui va entraîner un appel d'eau vers l'intérieur du zygote, ce qui provoque la formation du blastocèle. En plus des polarités membranaires, les cellules externes vont acquérir une polarité cytoplasmique et moléculaire. Une grande partie de leurs organites (RE, Golgi,...) va se retrouver près de la membrane basale. Il y a un regroupement des mitochondries, de l'appareil de Golgi et des lysosomes au pôle basal. Au stade 32 cellules, les cellules externes constituent les trophoblastes. Les trophoblastes vont former un épithélium étanche et continu appelé trophoctoderme, qui isole et protège les cellules internes qui donneront le futur embryon. Cette cavitation provoque également le positionnement des blastomères internes à un des pôles de l'œuf ; ces cellules constituent la masse cellulaire interne. A ce stade (64 cellules), l'œuf est appelé blastocyste précoce.

Au sein de la masse cellulaire interne, on distingue 2 types de cellules :

- les cellules qui sont en contact avec le blastocèle et qui constituent les hypoblastes donneront l'endoderme primitif. Elles vont acquérir un phénotype migratoire avant de donner l'endoderme, en recouvrant les cellules trophoblastiques, ce qui donnera l'endoderme viscéral et pariétal.
- L'autre type cellulaire sont les épiblastes qui donneront l'ectoderme primitif. Les cellules de la masse interne qui sont en contact avec le trophoctoderme sont les épiblastes. Les épiblastes donneront de nombreux types cellulaires : l'ectoderme, le mésoderme, de l'endoderme et les cellules germinales.

Les cellules externes donneront le trophoctoderme polaire et le trophoctoderme mural.

Conclusion :

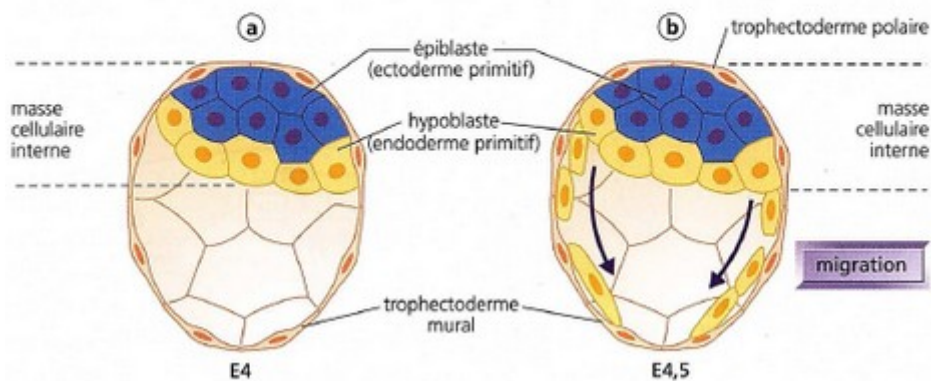
On sait, que ce soit chez les amphibiens, la souris ou l'homme, qu'il existe un plan d'organisation primaire commun chez tous les vertébrés.

Chez les amphibiens, la segmentation permet d'aboutir à la formation d'une blastula, et d'un blastocyste chez les mammifères.

Les étapes de gastrulation et de neurulation vont permettre la mise en place des 3 feuilletts et des axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

Enfin l'organogénèse permet la formation des différents organes.

Les lignages cellulaires du blastocyste précoce



Les lignages cellulaires au cours de la segmentation

