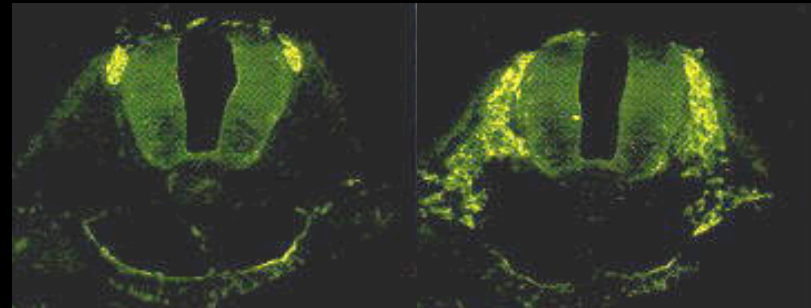


Biologie cellulaire et développement L2S4

Cours 1 - Morgane Locker



Morgane Locker

UMR 9197 NeuroPSI

Campus CEA Saclay, 151 route de la Rotonde

Bâtiment 151, 1er étage, bureau 1015

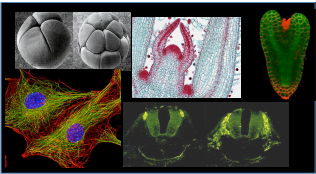
01-62-82-63-82

Morgane.locker@universite-paris-saclay.fr

**université
PARIS-SACLAY**

NeuroPSI
PARIS-SACLAY INSTITUTE OF NEUROSCIENCE

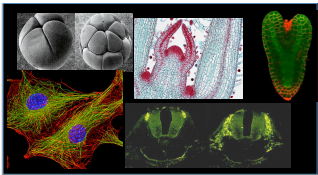
QUESTIONS DU JOUR



Que verrons-nous dans la partie Développement animal ?

*Que dois-je savoir pour bien démarrer les cours de Biologie du
Développement ?*





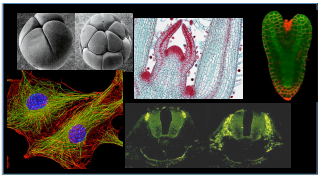
Objectifs d'apprentissage visés

Que dois-je savoir/savoir faire à l'issue de l'UE ?

ORGANISATION DU COURS DÉVELOPPEMENT ANIMAL

- ✓ Cours n°1: Introduction à la Biologie du développement animal et à ses méthodes d'études - **ENJEUX** : Acquérir le vocabulaire de base préalable à la description de phénotypes *in vivo* et se familiariser avec les systèmes développementaux dans lesquels les processus cellulaires du développement seront étudiés. Décrire le principe des techniques/outils d'analyse couramment utilisés en Biologie cellulaire et Développement, formuler les questions biologiques associées et maîtriser les bases de la démarche scientifique indispensable à l'analyse d'expériences.
- ✓ Cours n°2: Phénomènes d'induction et destinées embryonnaires au cours du développement animal - **ENJEUX** : Illustrer l'importance de la communication intercellulaire (facteurs paracrines et morphogènes) dans le devenir des tissus embryonnaires.
- ✓ Cours n°3: Processus migratoires au cours du développement animal - **ENJEUX** : Illustrer l'importance de la communication intercellulaire (cadhérines et protéines matricielles) dans le contrôle de la migration.
- ✓ Séance de travail/révisions sur les cours de développement animal (Wooclap)
- ✓ Cours n°4: Cellules souches et différenciation cellulaire - **ENJEUX** : Aborder la notion de cellules souches et illustrer la dynamique du processus de différenciation.

OAV à consulter régulièrement : <https://ecampus.paris-saclay.fr/mod/page/view.php?id=1891956>



Objectifs d'apprentissage visés

Que dois-je savoir/savoir faire à l'issue de l'UE ?

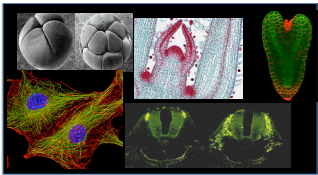
CONSEILS D'ORGANISATION

- ✓ Travaillez régulièrement. Aidez-vous pour cela du planning de révisions proposé : <https://ecampus.paris-saclay.fr/course/view.php?id=164801§ion=1>
- ✓ Utilisez les cours en ligne (facultatif); ils sont conçus pour vous aider à synthétiser les principales connaissances à acquérir et faire le lien entre les 3 sous-disciplines enseignées dans cette UE (BC, BDA, BDV).
- ✓ Testez chaque semaine votre compréhension et vos connaissances à l'aide des quizz d'auto-évaluation.
- ✓ Faites les travaux obligatoires demandés.
- ✓ En cas de problème : contactez votre enseignant de TD ou d'amphi.

EXAMENS

- ✓ Des annales de partiel/examen sont à votre disposition sur le cours e-Campus dans la section « Généralités »

<https://ecampus.paris-saclay.fr/course/view.php?id=164801§ion=0>



Plan de cours de la partie développement animal

1- Introduction à la Biologie du Développement animal

- 1.1- Les questions de la Biologie du développement
- 1.2- Les processus cellulaires du développement
- 1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope
- 1.4- Principes et outils de base du GOF/LOF
- 1.5- Les techniques de perturbation génique
- 1.6- Principes de l'analyse phénotypique

2- Communication intercellulaire et choix de destin au cours du développement animal

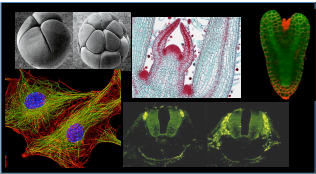
- 2.1- Définition de l'induction
- 2.2- Inductions embryonnaires précoces dans l'embryon de Xénope
- 2.3- Un exemple d'induction tardive : la régionalisation des somites

3- Communication intercellulaire et phénomènes migratoires dans l'embryon de vertébré

- 3.1- Les crêtes neurales: définition et lignage dans l'embryon
- 3.2- Influence des interactions cellules/cellules et cellules/matrice dans la TEM et la migration
- 3.3- Communication intercellulaire et guidage de la migration

4- Cellules souches et différenciation cellulaire

- 4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement: des cellules pluripotentes au dérivés différenciés
- 4.2- Les cellules souches adultes
- 4.3- Caractéristiques des cellules musculaires striées
- 4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules musculaires striées



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.1- Les Questions de la Biologie du développement

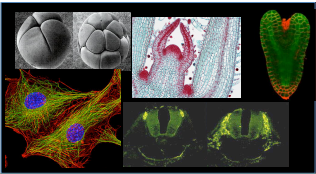
- ✓ Théorie de la préformation: explique le développement embryonnaire par le déploiement de structures préexistantes dans l'œuf.
- ✓ Opposition historique à la théorie de l'épigenèse (déjà défendue par Aristote au IV^{ème} siècle avant JC) selon laquelle les organes apparaissent progressivement au cours de la croissance embryonnaire et sont sous l'influence de forces extérieures.
- ✓ La théorie de l'épigenèse l'emporte au XIX^{ème} siècle avec l'émergence de l'embryologie expérimentale.
- ✓ Le XX^{ème} siècle dévoile la préexistence d'un CODE (programme génétique du développement) régulant le développement.

Animalculistes



Ovistes



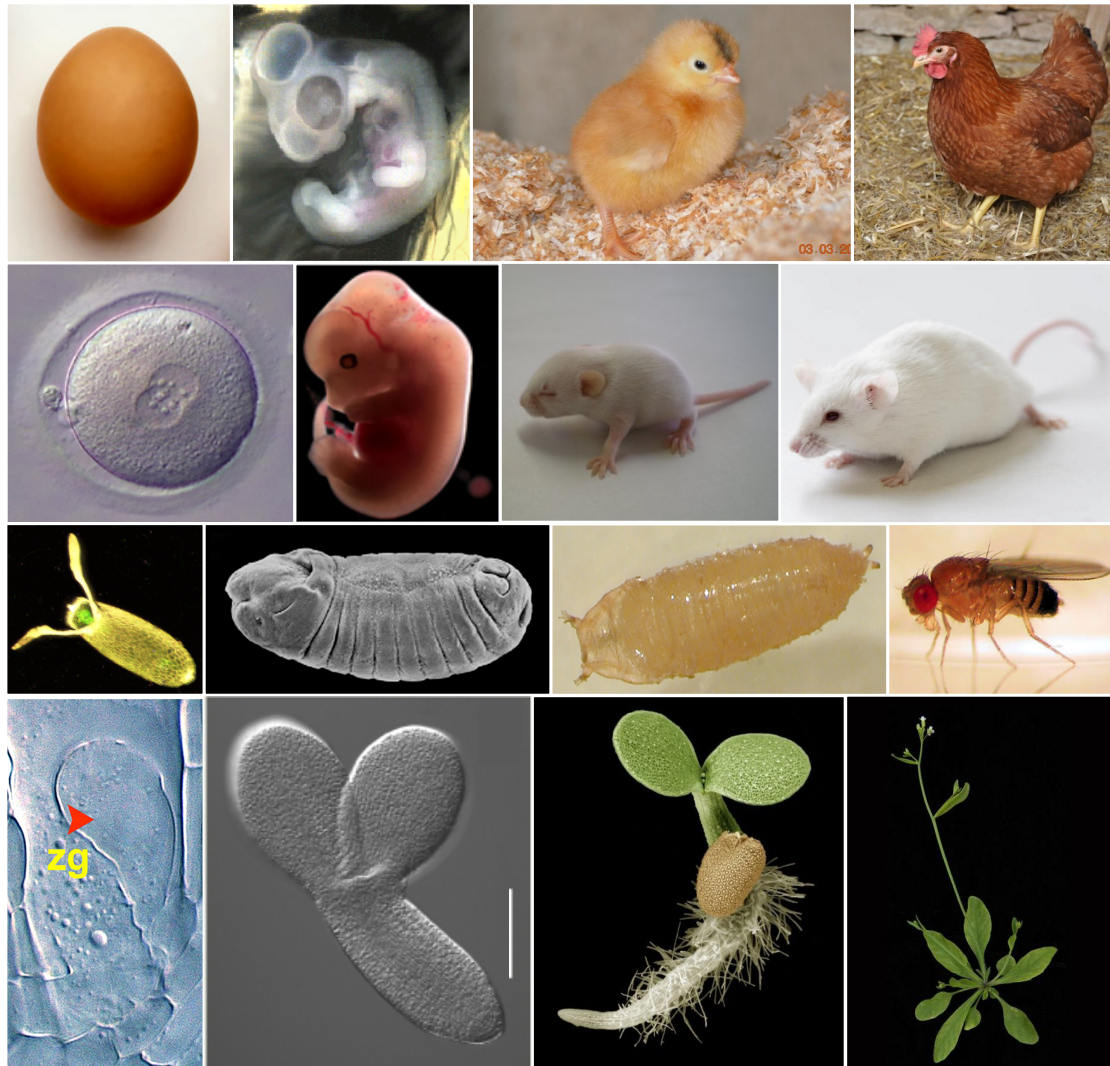


1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.1- Les Questions de la Biologie du développement

Développement embryonnaire Développement post-embryonnaire

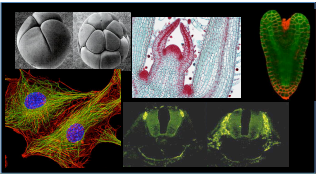
Œuf Embryon Juvénile/larve/plantule Adulte



MÉCANISMES À L'ŒUVRE

- ✓ Comment se fait la mise en place du plan d'organisation de l'espèce à partir d'une cellule unique ?
- ✓ Quels sont les processus mis en jeu à l'échelle cellulaire/moléculaire ?
- ✓ Comment se coordonnent-ils dans le temps et dans l'espace ?

Lien intime de la Biologie du développement avec la Biologie cellulaire/moléculaire et la génétique



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.1- Les Questions de la Biologie du développement

De nombreuses pathologies découlent de problèmes développementaux

- ✓ Liés à des mutations de gènes
- ✓ Liés à l'exposition des embryons à des substances toxiques ou tératogènes

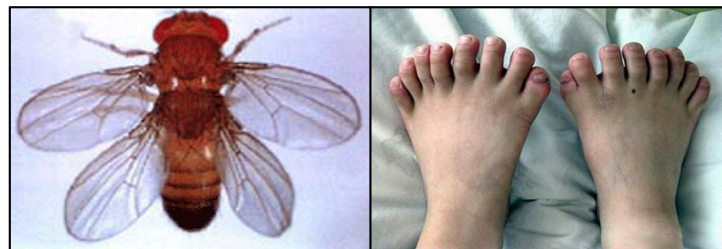
Spina bifida chez le xénope (g) ou l'homme (d)



Cyclopie chez l'agneau (g) ou l'homme (d)



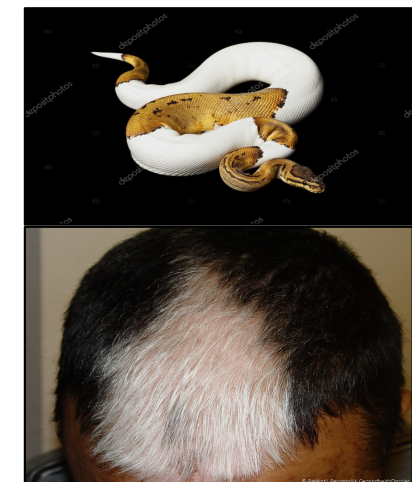
Structure dupliquées chez la drosophile (g) ou l'homme (d)



Syndrome d'alcoolisation fœtale (g) et effets du thalidomide (d)

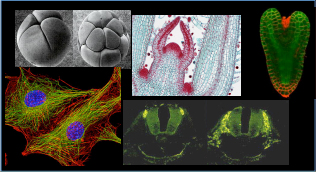


Défauts de pigmentation chez le serpent (h) ou l'homme (b)



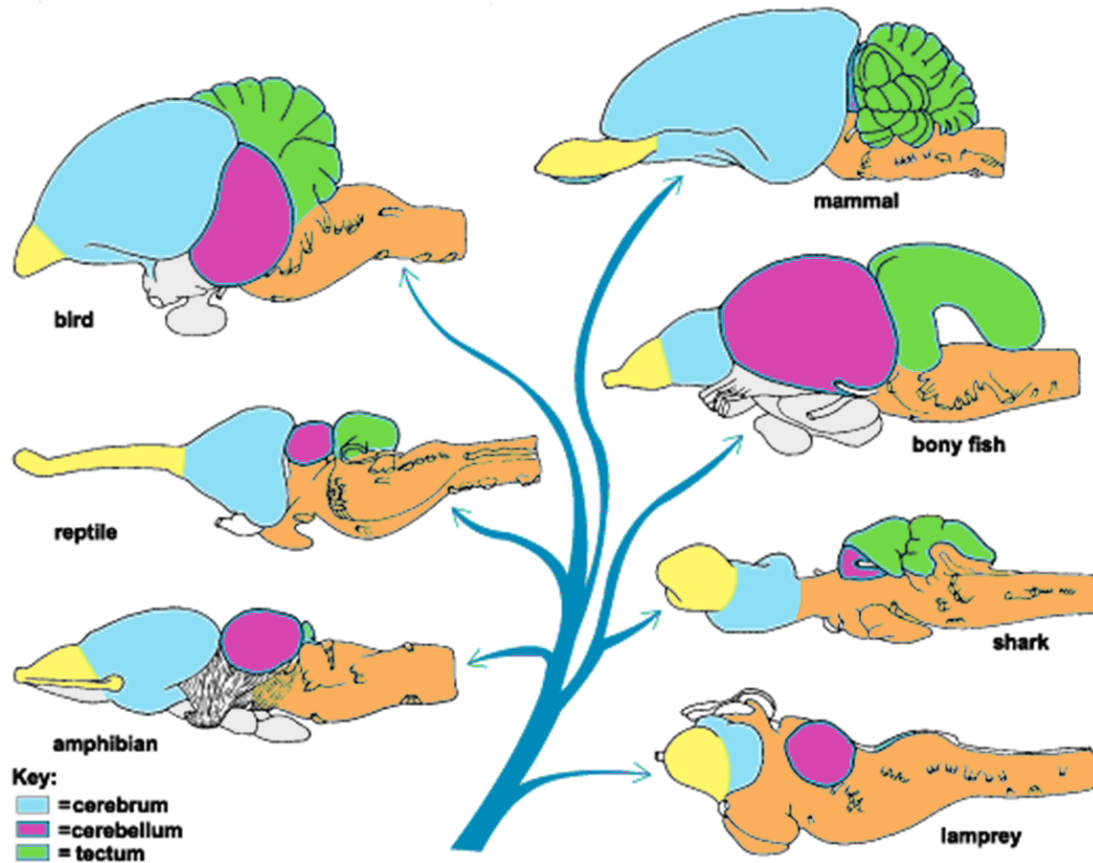
Embryons de xénope (g) et nourrissons siamois (d)





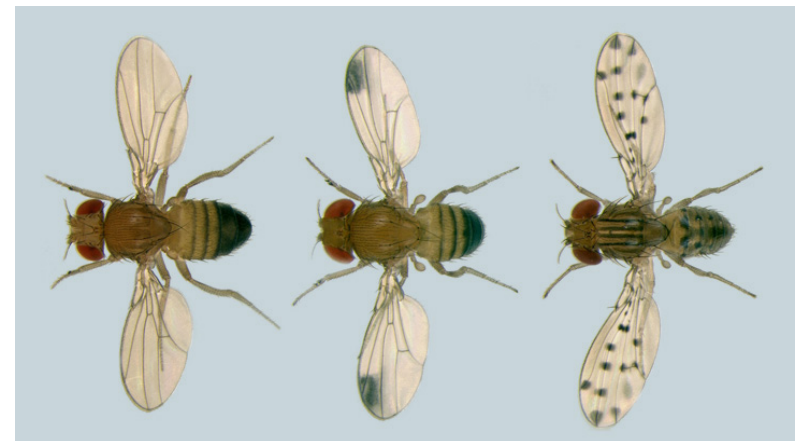
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.1- Les Questions de la Biologie du développement

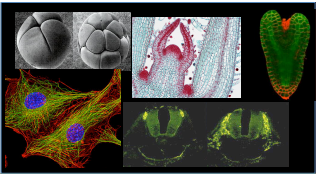


- ✓ Les processus développementaux sont-ils évolutivement conservés ?
- ✓ Quel est l'impact de modifications de ces processus sur l'évolution des espèces ?

Lien intime de la Biologie du développement avec la Biologie de l'évolution (Évo-dévo; PROGRAMME L3)

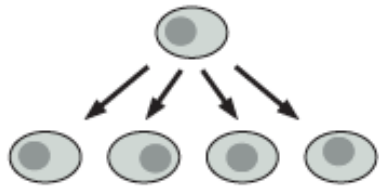


https://www.youtube.com/watch?v=ydqReeTV_vk

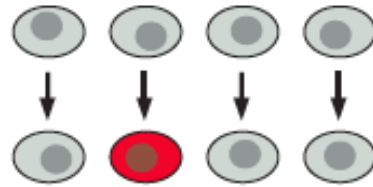


1- Introduction à la Biologie du Développement animal

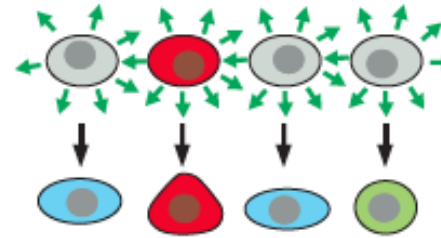
1.2- Les processus cellulaires du développement



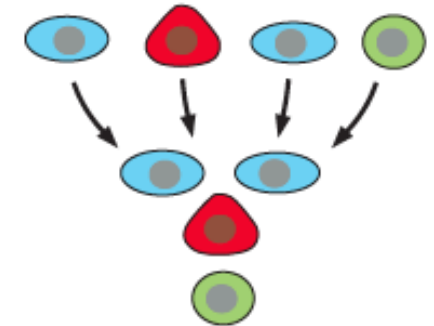
DIVISION CELLULAIRE



DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

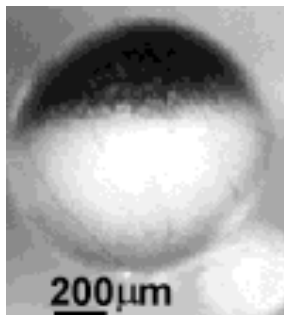


INTERACTION CELLULAIRE



MIGRATION CELLULAIRE

Zygote

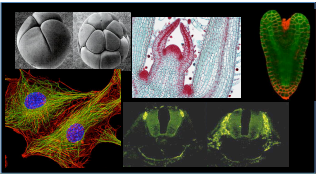


Intégration de ces processus en 4 dimensions



Organisme multicellulaire





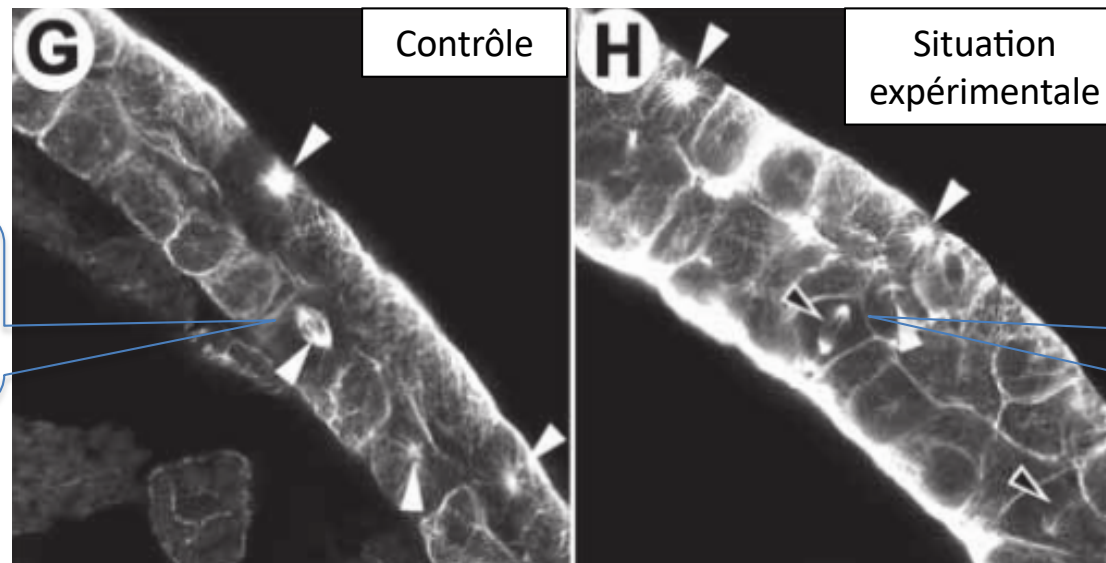
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.2- Les processus cellulaires du développement

Focus sur la division cellulaire

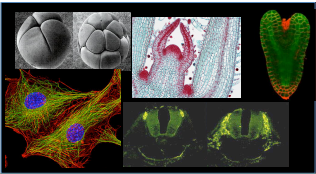
- ✓ Indispensable à l'acquisition de la multicellularité dès le début du développement.
- ✓ **ATTENTION**: se poursuit dans tous les tissus en développement jusqu'à atteinte de leur taille définitive.
- ✓ Processus extrêmement contrôlé (cf. cours sur le contrôle du cycle cellulaire).
- ✓ Dérégulations à l'origine de tumeurs.
- ✓ L'orientation des divisions contribue à la morphogenèse du tissu en formation.

TD2



Mitose dans le plan de l'épithélium: allongement

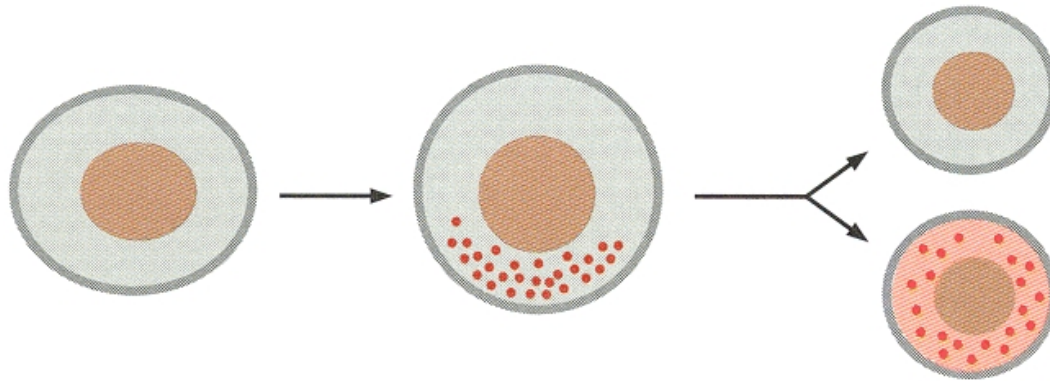
Mitose perpendiculaire au plan de l'épithélium: épaissement



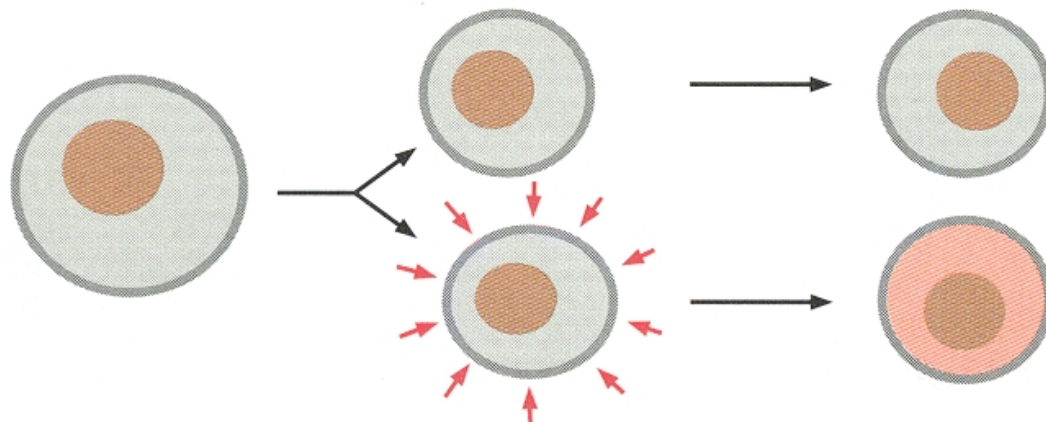
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.2- Les processus cellulaires du développement

Focus sur la division cellulaire



1. asymmetric division : sister cells born different



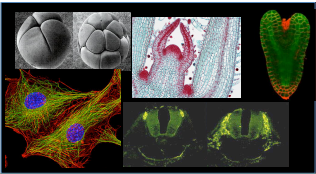
2. symmetric division : sister cells become different as result of influences acting on them after their birth

✓ La manière dont les cellules se divisent peut influencer leur devenir

✓ Endoreduplication/endomitose :
exemples en BV. **TD3**

✓ Division symétrique ou asymétrique
via l'héritage de déterminants
cytoplasmiques ou *via* un effet de
position: exemples en BA et BV.

Attention: ces 2 modalités ne
sont pas mutuellement
exclusives!!



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.2- Les processus cellulaires du développement

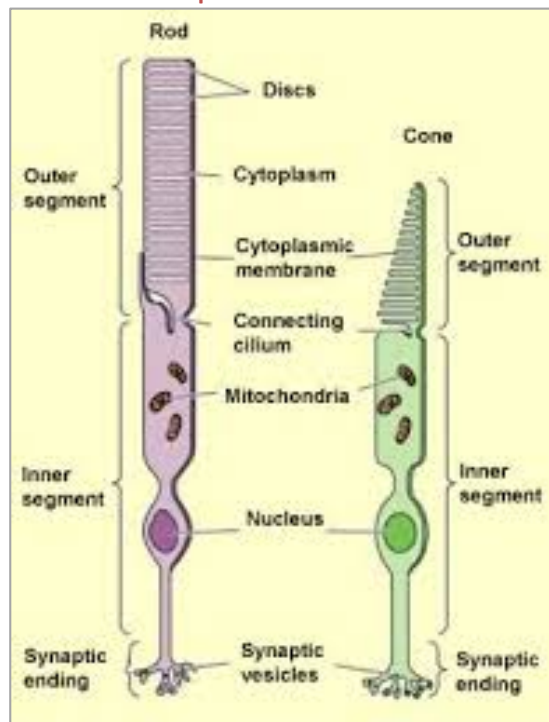
Focus sur la différenciation cellulaire

✓ Définition: Ensemble des processus qui permettent à une cellule d'acquérir, de maintenir et de moduler sa forme (éventuelle polarité; structures subcellulaires particulières) et ses fonctions spécialisées.

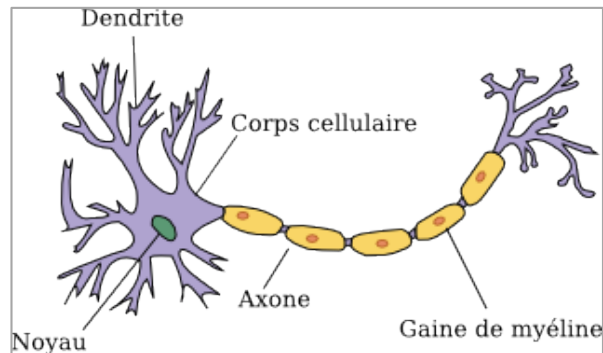
✓ Les cellules différenciées expriment un ensemble de **gènes/protéines spécifiques de leur fonction**.

TD7

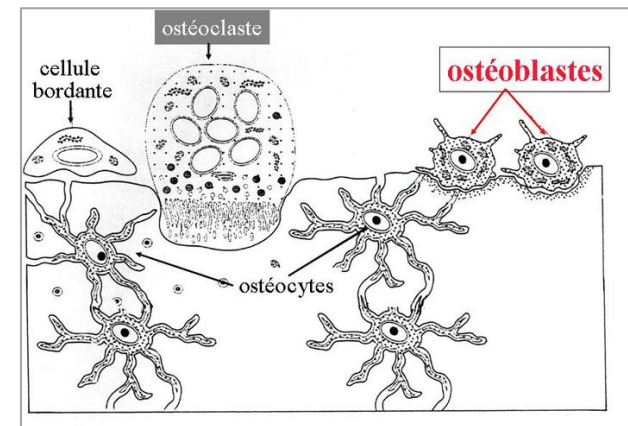
Photorécepteurs de la rétine



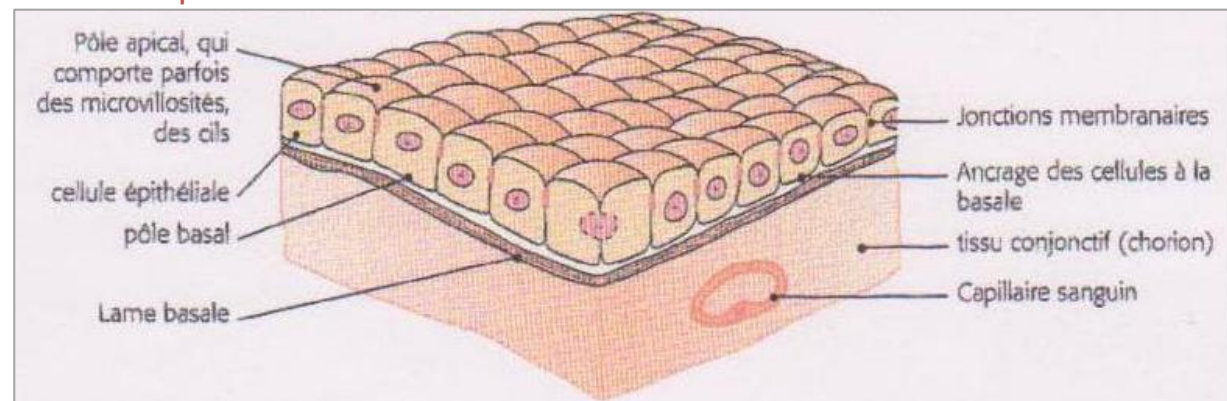
Neurone

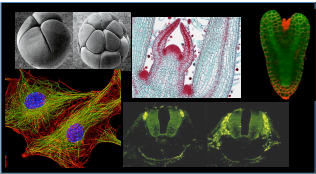


Cellules osseuses



Cellules épithéliales

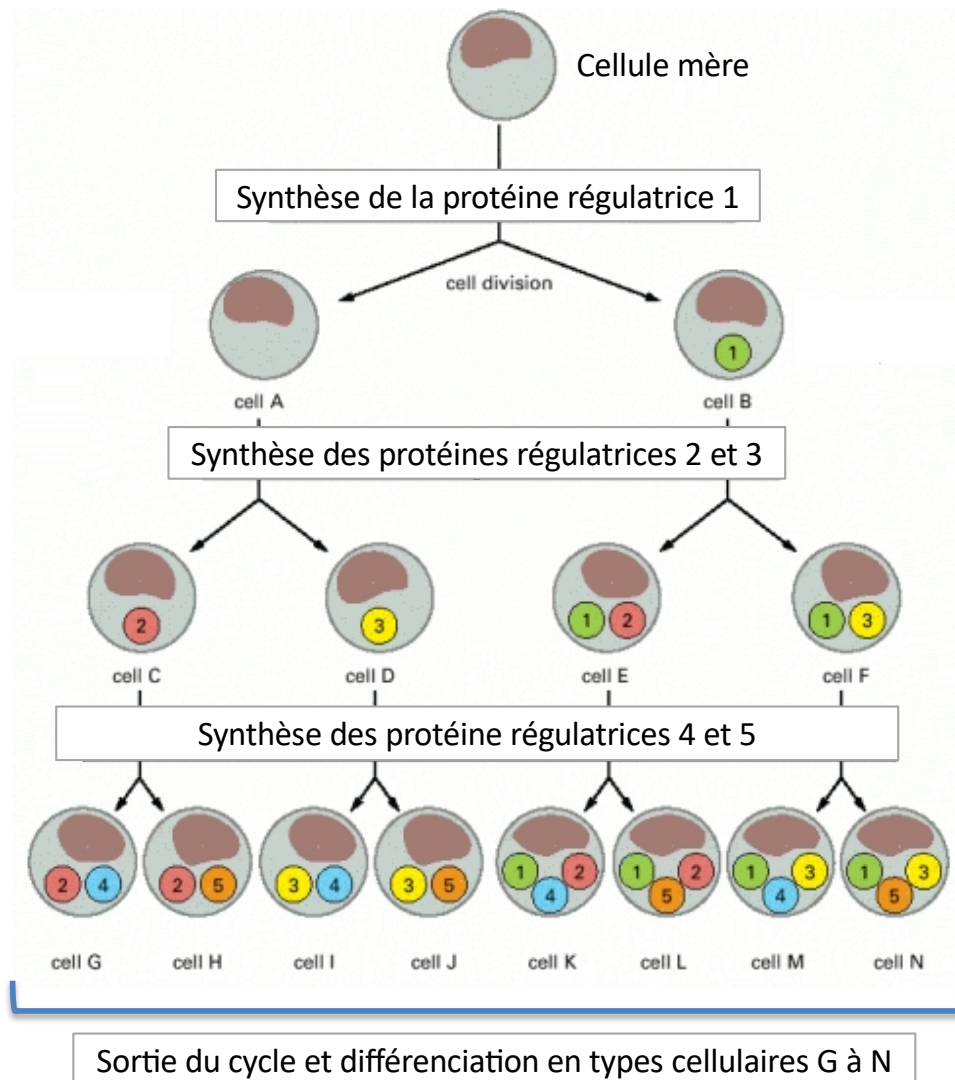




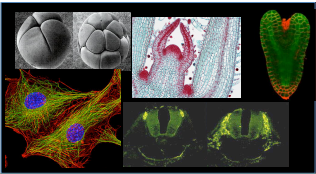
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.2- Les processus cellulaires du développement

Focus sur la différenciation cellulaire



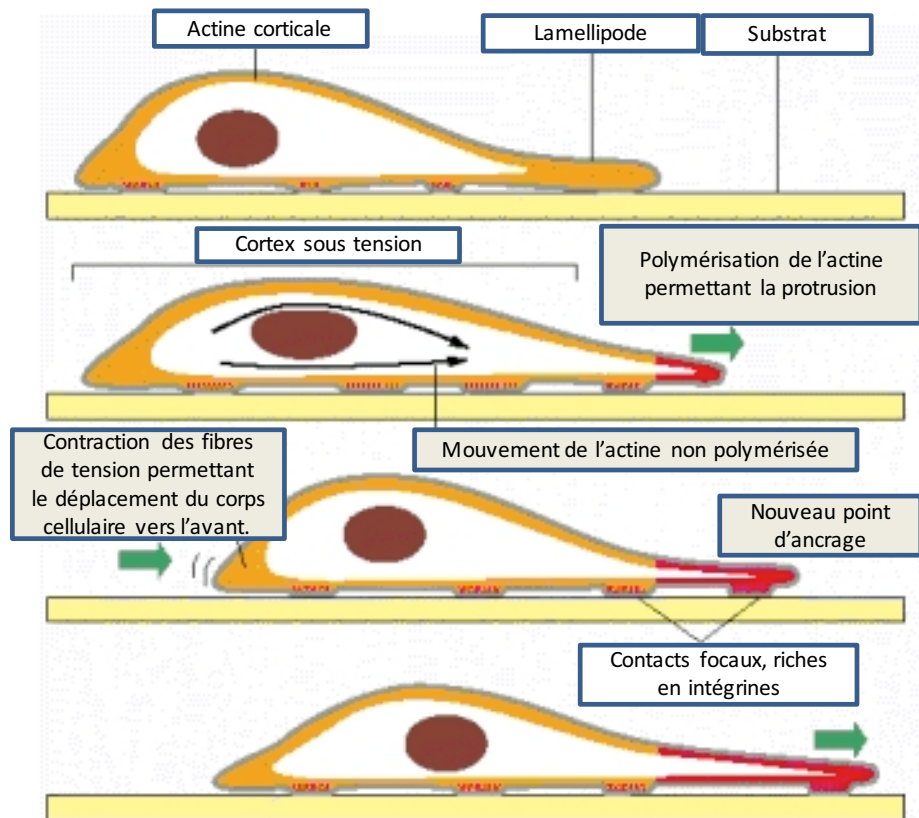
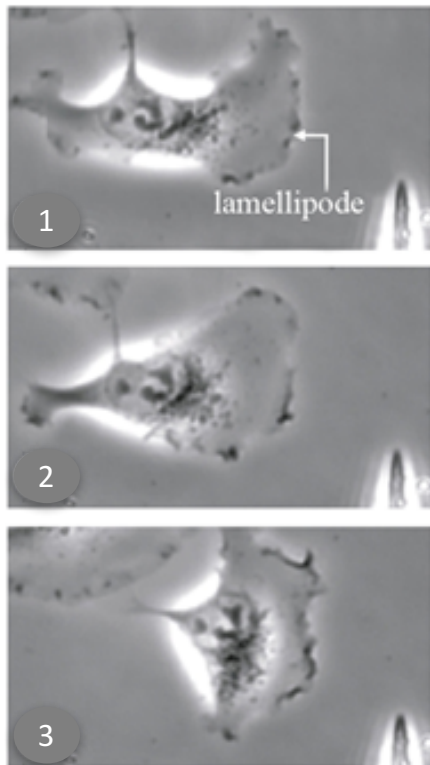
- ✓ Les cellules complètement différenciées ne se divisent généralement plus (cellules post-mitotiques).
- ✓ Les différents types cellulaires différenciés sont les descendants de cellules prolifératives appelées « **progéniteurs ou cellules progénitrices** ».
- ✓ Au fil des divisions des progéniteurs, le destin terminal des cellules filles est progressivement fixé sous l'influence de facteurs intrinsèques ou de signaux extérieurs. On parle de **détermination cellulaire**.
- ✓ L'ensemble des cellules issues d'un ancêtre commun s'appelle **un lignage**.



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.2- Les processus cellulaires du développement

Focus sur la migration cellulaire



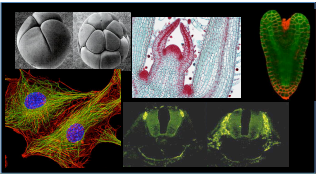
TD6

1- **Protrusion** : extension d'un lamellipode « exploratoire » au front de migration.

2- **Adhésion** : Création de nouveaux points d'ancrage à l'avant.

3- **Translocation et rétraction**: Le corps cellulaire avance puis déconnecte les contacts focaux postérieurs.

4- Un nouveau cycle commence.



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.2- Les processus cellulaires du développement

La communication intercellulaire est indispensable à la coordination spatio-temporelle de ces comportements cellulaires

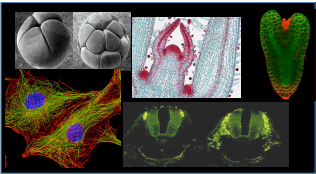
✓ À l'échelle de l'embryon:

- Pour mettre en place le schéma corporel/plan d'organisation.
- Pour induire des territoires, des frontières.

TD1, TD5,
TD6, TD7

✓ À l'échelle des tissus/organes en développement:

- Pour contrôler le nombre de divisions, leur orientation.
- Pour fixer progressivement les destinées cellulaires de l'embryon.
- Pour contrôler quand et où doivent se différencier des types cellulaires précis.
- Pour que des cellules qui migrent se déplacent et trouvent leur route.
- Pour permettre la morphogenèse des cellules/tissus/organes.



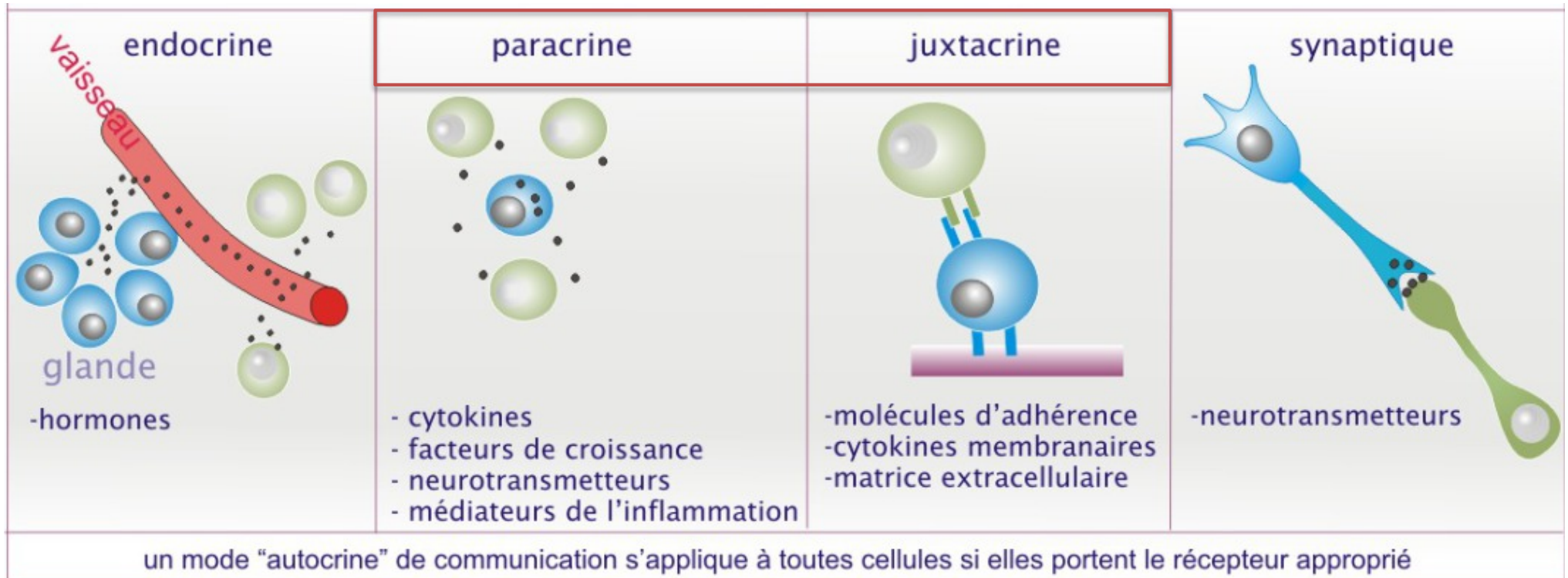
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

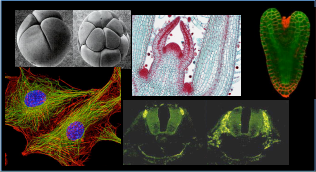
1.2- Les processus cellulaires du développement

Principes de bases de la communication

✓ Qui communique ? Deux partenaires: un groupe de **cellules « émettrices »** d'un signal (ou **cellules « inductrices »**) et les **cellules « réceptrices »** qui ne peuvent y répondre que si elles sont **compétentes**.

✓ Les grands modes de communication:

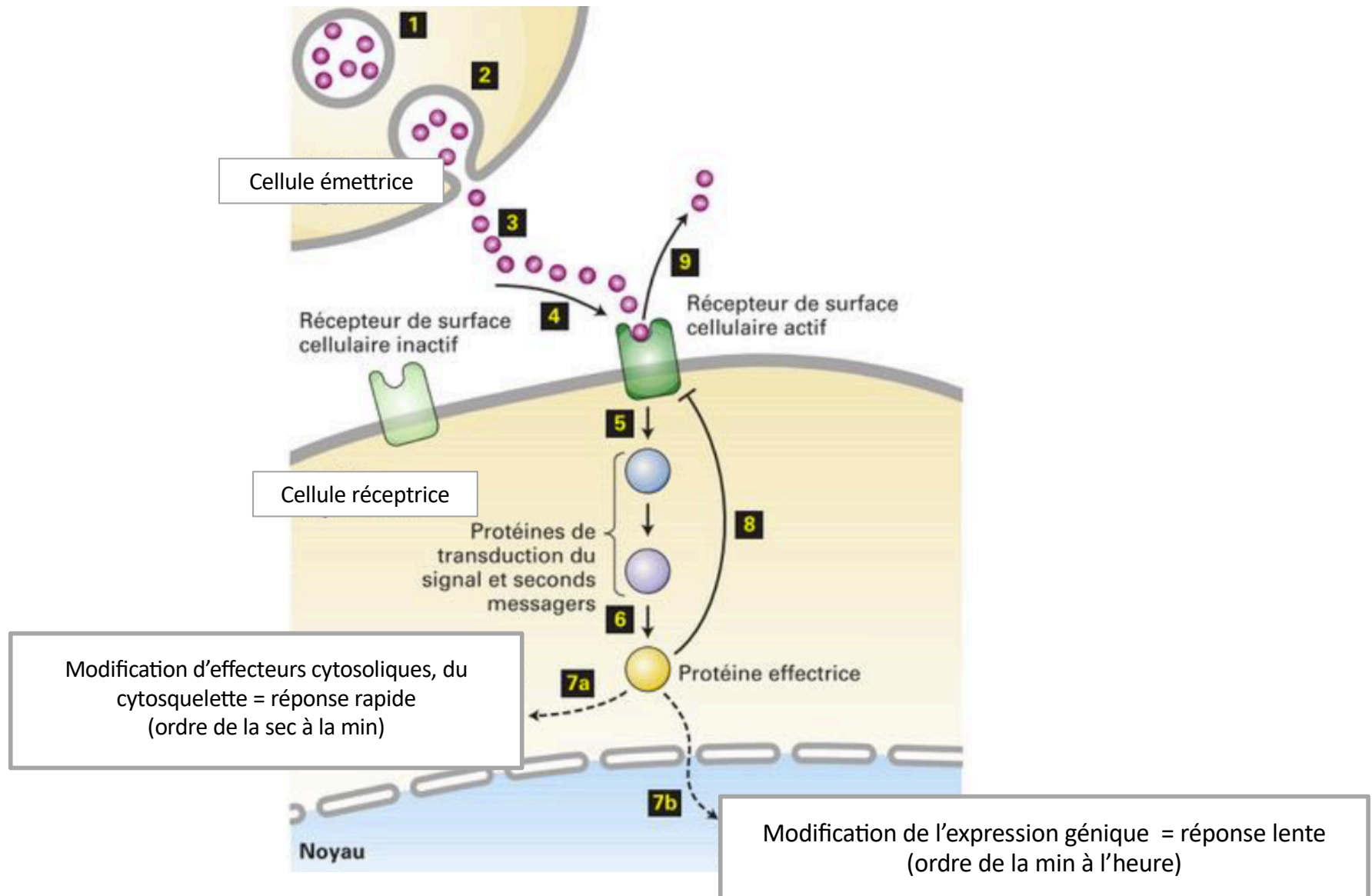


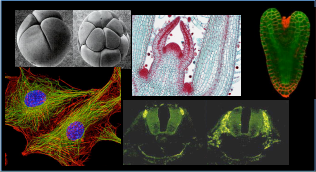


1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.2- Les processus cellulaires du développement

Les acteurs de la transduction du signal

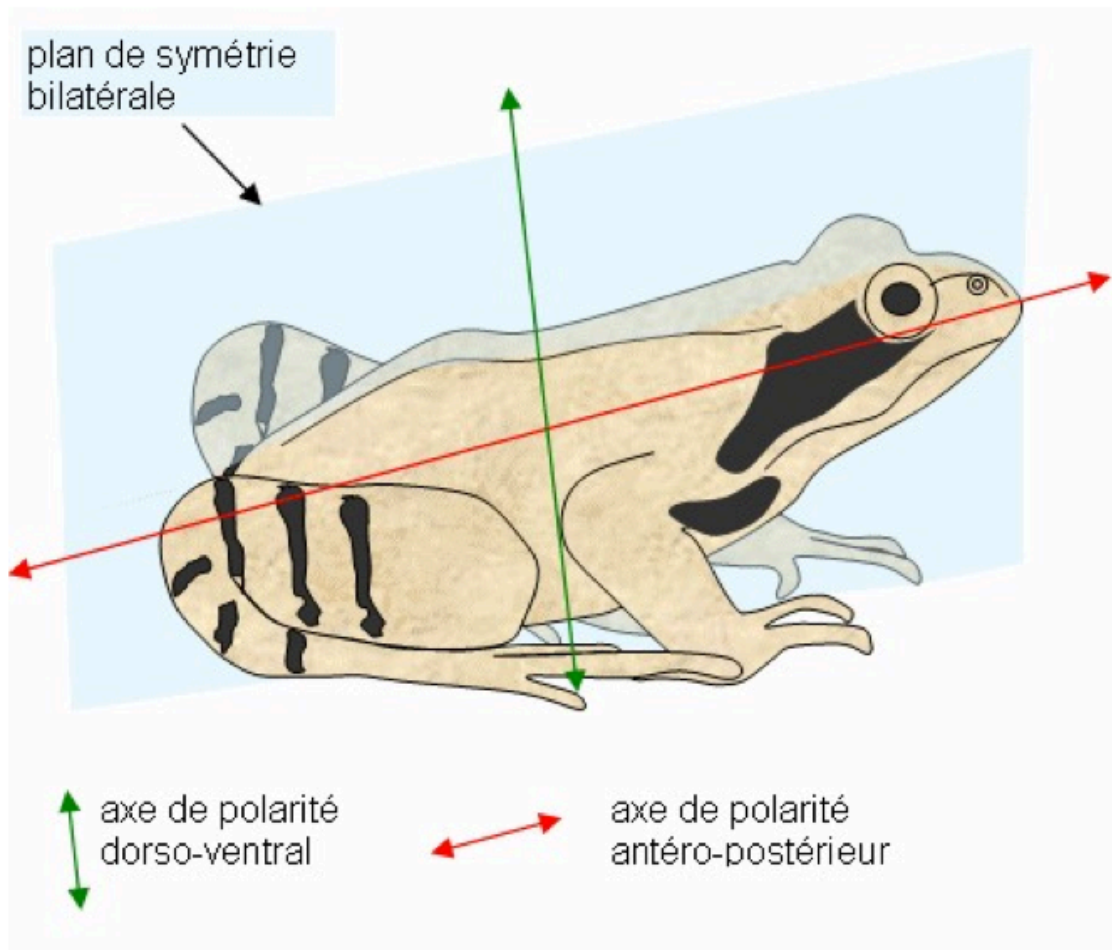




1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

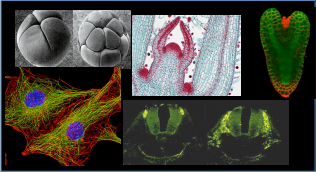
Plan d'organisation de l'amphibien



Axes de polarités communs aux bilatériens:

- ✓ Axe antéro-postérieur
- ✓ Axe droite-gauche
- ✓ Axe dorso-ventral

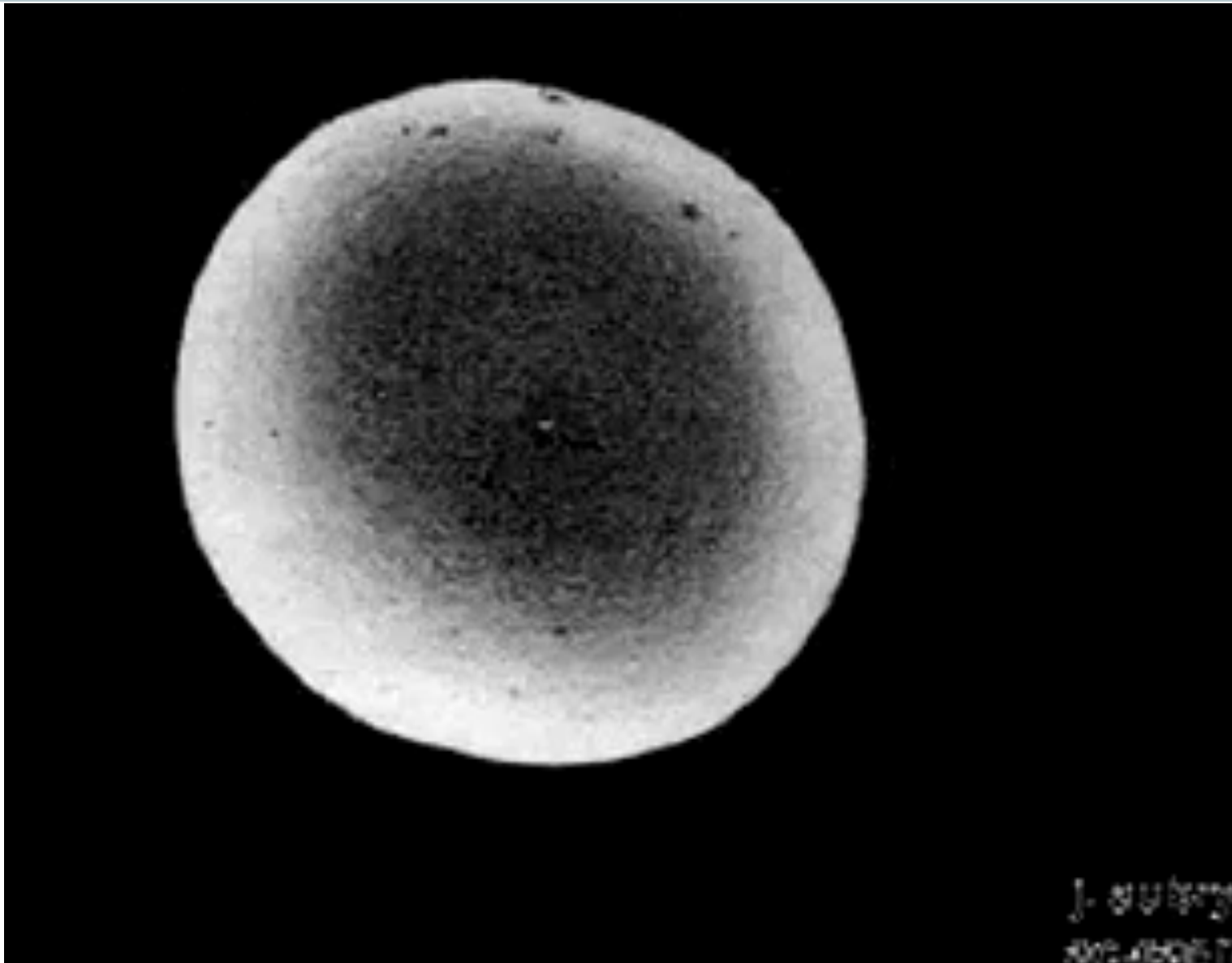
L'organisme présente une symétrie bilatérale par rapport à l'axe antéro-postérieur (symétrie axiale).



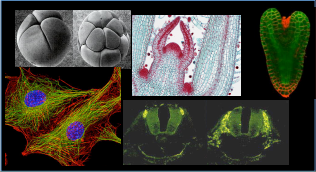
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

Observation macroscopique du développement



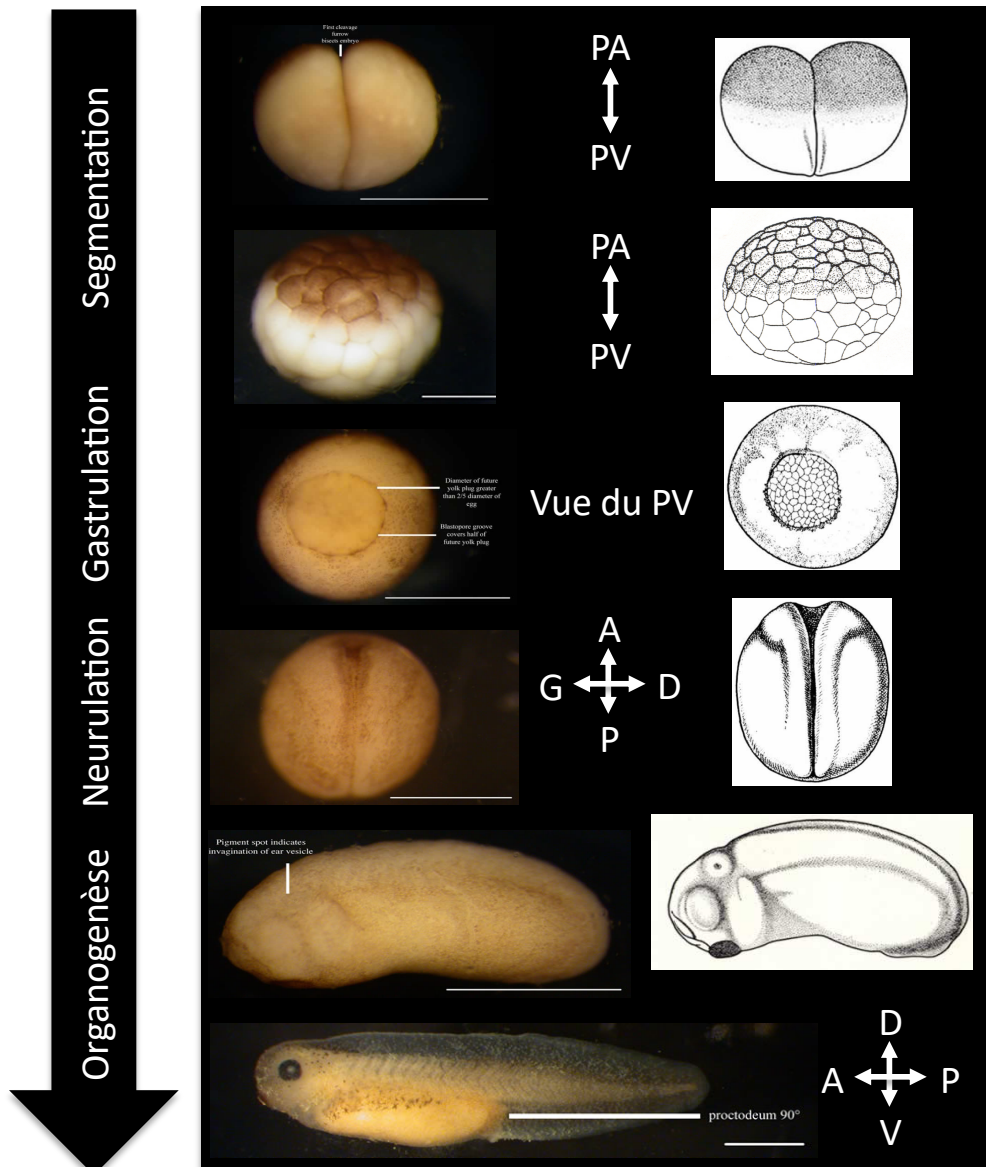
J. M. S. 2007
2007-05-07



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

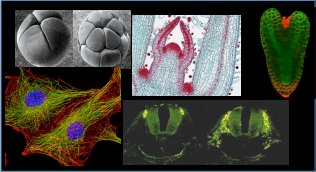
1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

Observation macroscopique du développement (rappels de L1)



À cette échelle, j'ai observé :

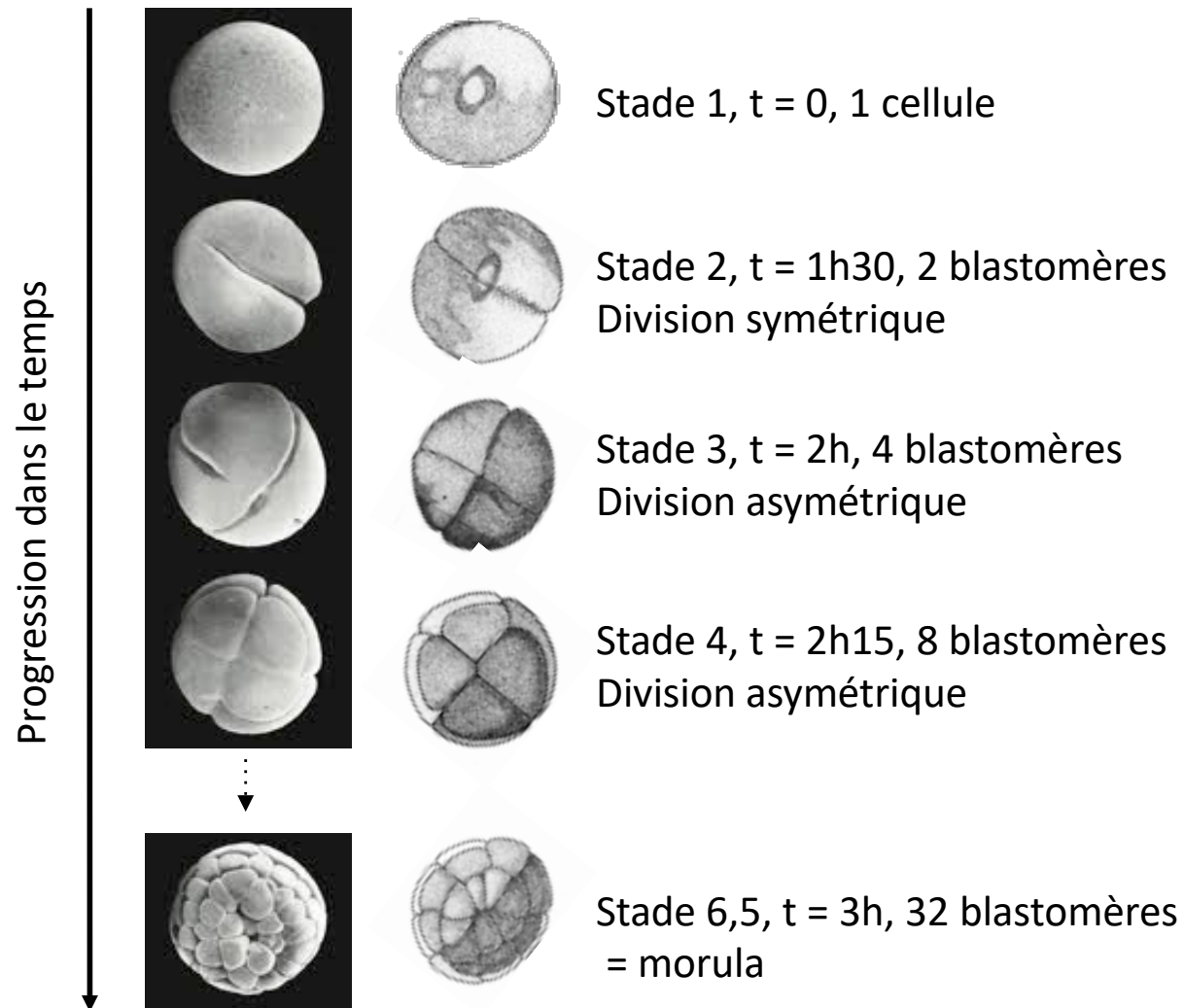
- ✓ Des divisions cellulaires sans augmentation de la taille de l'embryon (**segmentation**).
- ✓ L'apparition d'une fente et des mouvements tissulaires (**gastrulation**).
- ✓ Le soulèvement puis la fermeture de tissus dorsaux (**neurulation**).
- ✓ L'allongement de l'embryon dans l'axe antéro-postérieur et l'apparition d'organes (dont yeux, plaque adhésive, branchies; **organogenèse**): le plan d'organisation devient visible.

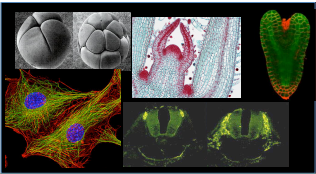


1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

La segmentation





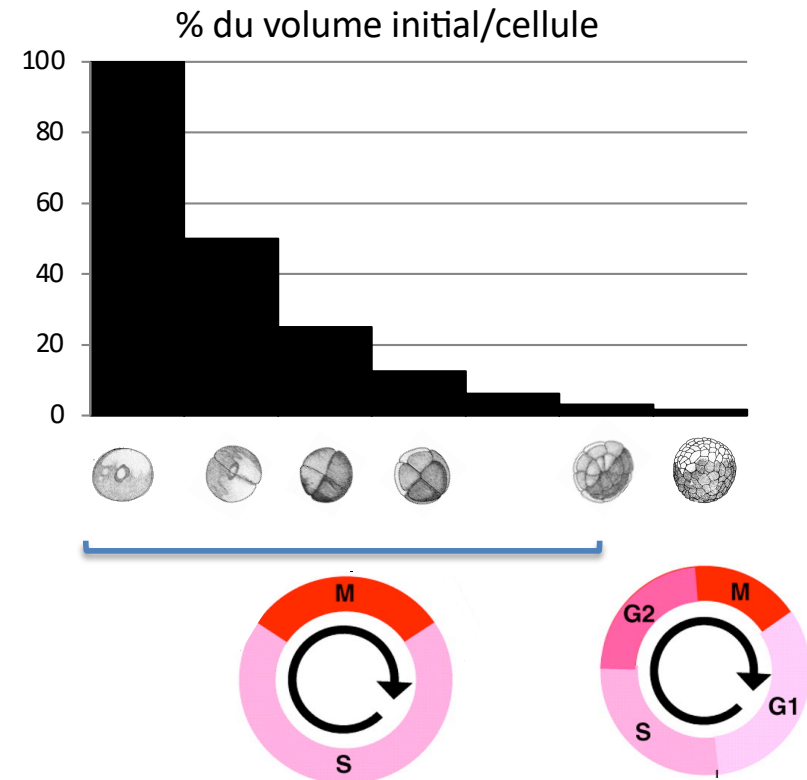
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

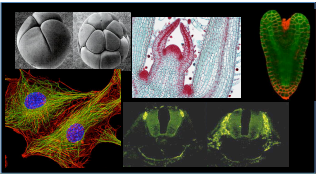
1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

La segmentation

Diminution de la taille des cellules au fil des divisions de la segmentation: un phénomène lié à l'absence de phase G1/G2

- ✓ Les cycles enchainent phases S et M.
- ✓ La réapparition des phases G2 puis G1 n'a lieu qu'au moment de la **transition mid-blastuléenne** au stade 7 (t = 4h).
- ✓ Elle s'accompagne de la **reprise de l'expression du génome zygotique** (avant cela, aucune transcription, l'embryon ne fonctionne que sur les réserves d'ARNm et protéines accumulés au cours de l'ovogenèse !!).

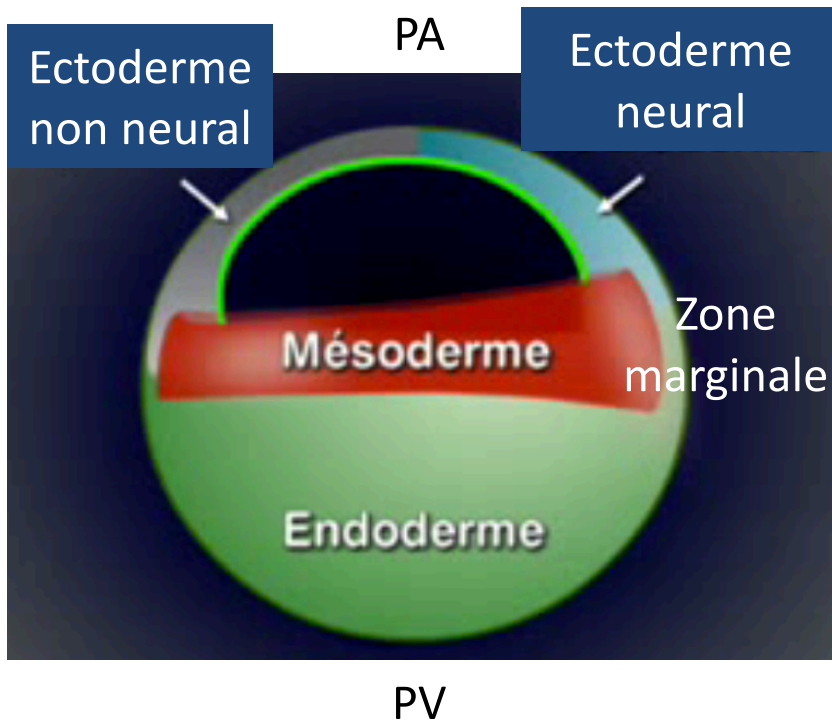




1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

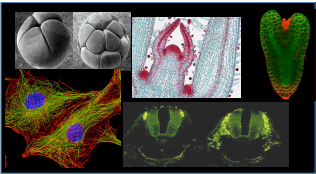
Les feuilletts embryonnaires : tissus fondateurs des futurs tissus adultes



En fin de segmentation (stade **blastula**):

- ✓ Une cavité s'est créée: le **blastocoele**.
- ✓ Toutes les cellules ne sont pas équivalentes.
- ✓ 3 tissus appelés « **feuilletts embryonnaires** » aux destinées différentes se sont formés (voir cours 2):
 - L'**endoderme** au pôle végétatif
 - L'**ectoderme** au pôle animal
 - Le **mésoderme** entre les 2, dans la zone marginale

Ectoderme	Mésoderme	Endoderme
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Épiderme ▪ Système nerveux 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Derme ▪ Muscles ▪ Cartilage, os ▪ Cœurs, vaisseaux, cellules sanguines ▪ Reins, gonades 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tube digestif ▪ Foie, pancréas ▪ Poumons ▪ Vessie

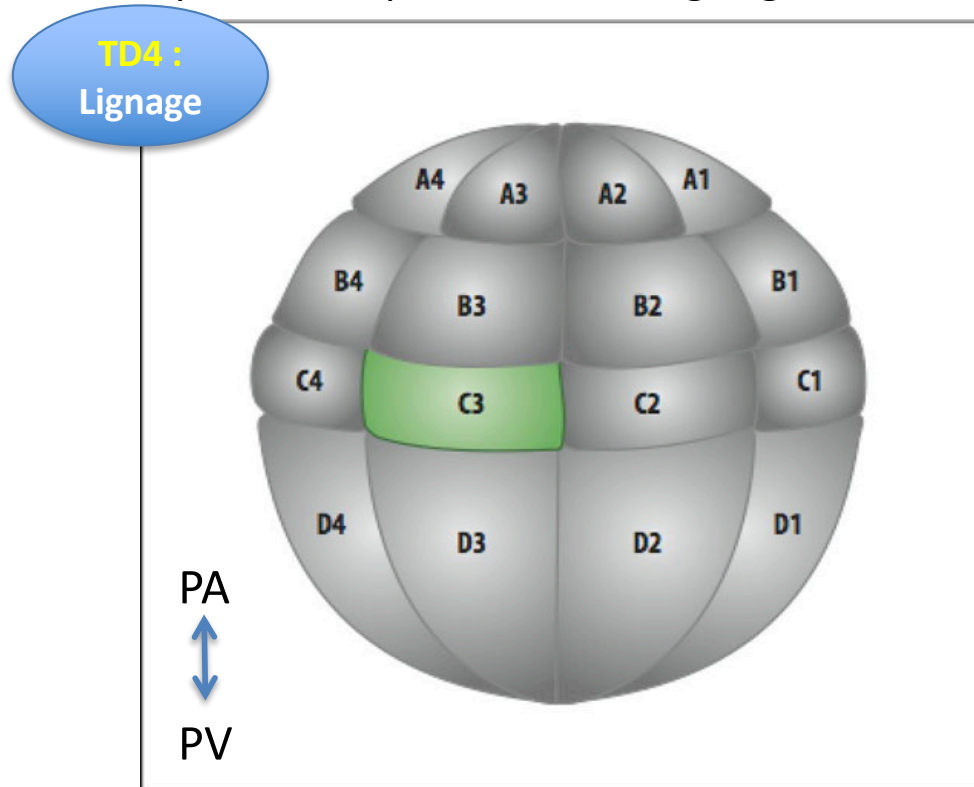


1- Introduction à la Biologie du Développement animal

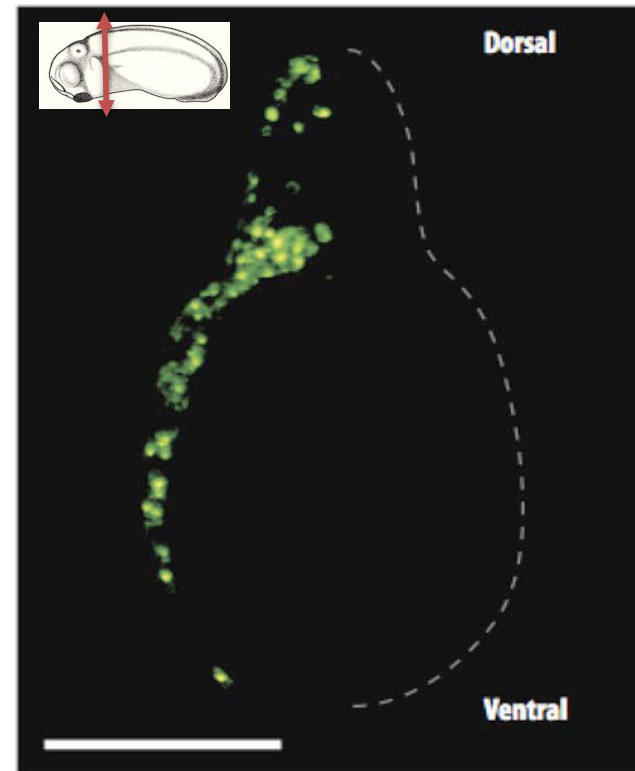
1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

Principe d'une expérience de lignage et établissement d'une carte des territoires présomptifs

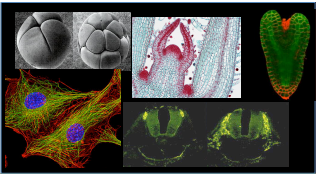
✓ À chaque stade, tous les destins ne sont pas encore fixés mais on peut tracer le devenir des cellules par des expériences de lignage.



Microinjection d'un traceur observable (GFP) à un stade choisi (morula ici)



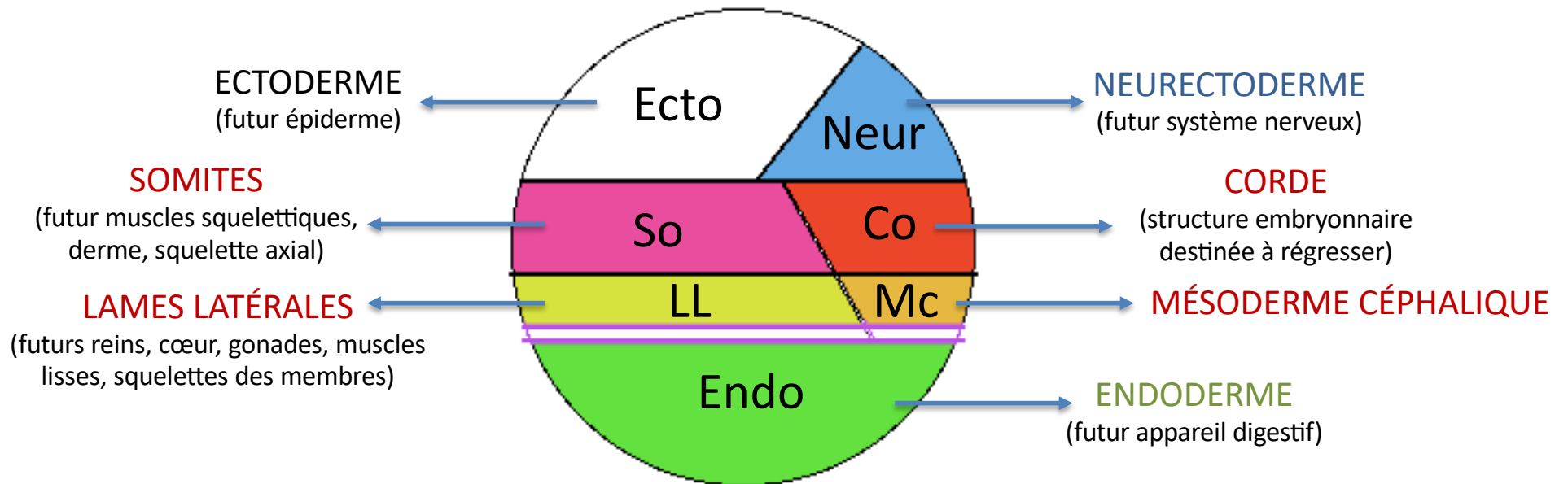
Observation du marquage à un stade plus tardif: coupe transversale au stade de bourgeon caudal



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

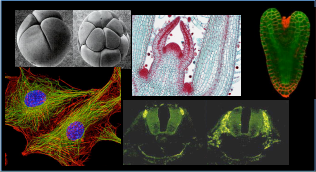
1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

Principe d'une expérience de lignage et établissement d'une carte des territoires présomptifs



✓ La carte des territoires présomptifs n'indiquent pas l'état de différenciation des cellules MAIS LEUR DEVENIR PROBABLE À UN STADE PLUS TARDIF.

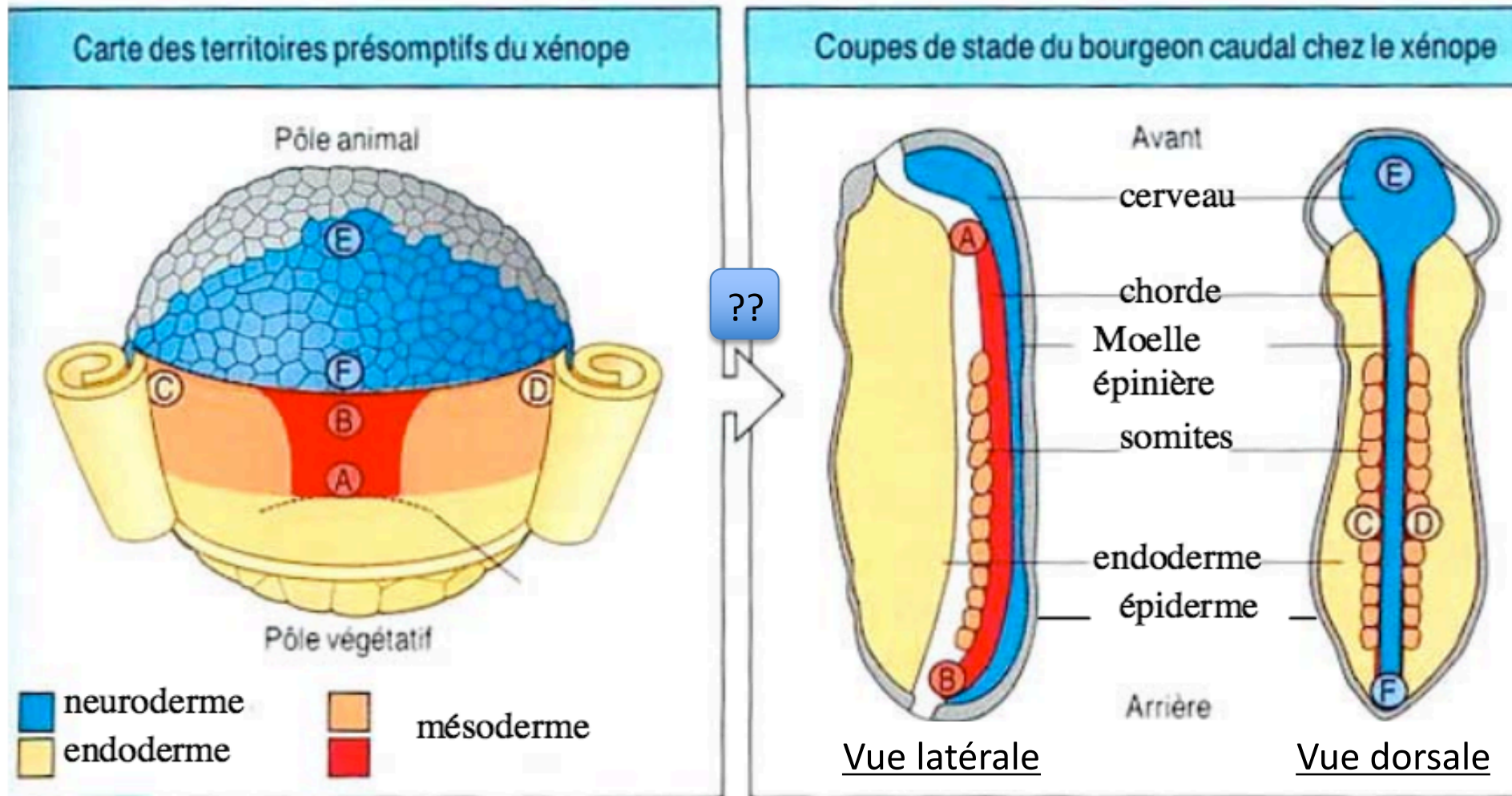
✓ Comme les destinées évoluent au cours du temps, on peut dresser des cartes à tous les stades.

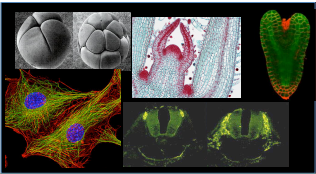


1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

La gastrulation ou comment passe-t-on de feuilletés organisés selon l'axe PA-PV à des feuilletés externes, intermédiaires, internes

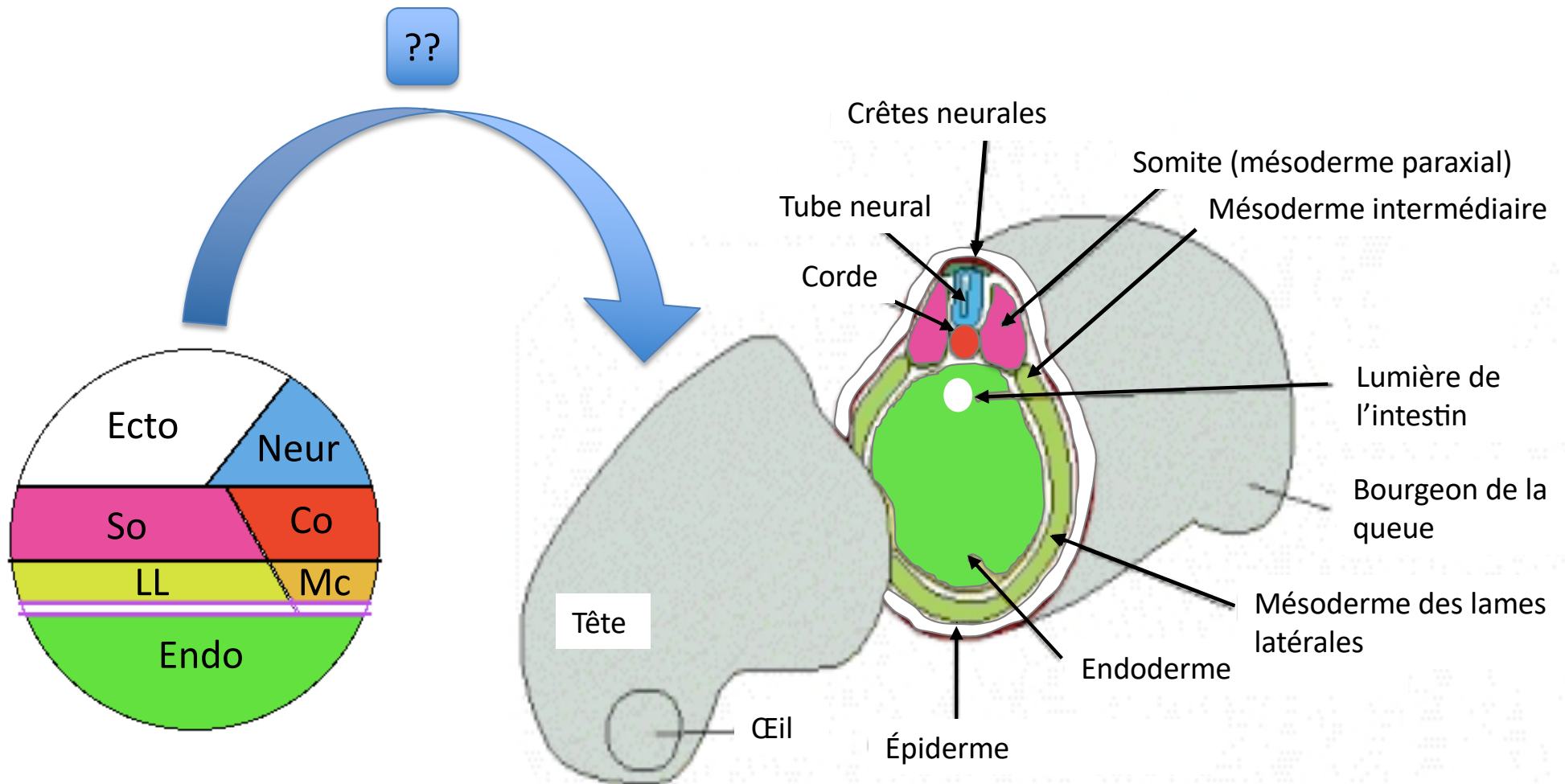


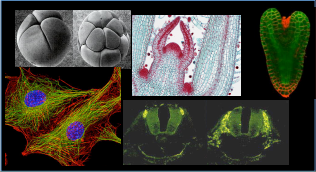


1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

La gastrulation ou comment passe-t-on de feuilletés organisés selon l'axe PA-PV à des feuilletés externes, intermédiaires, internes ?

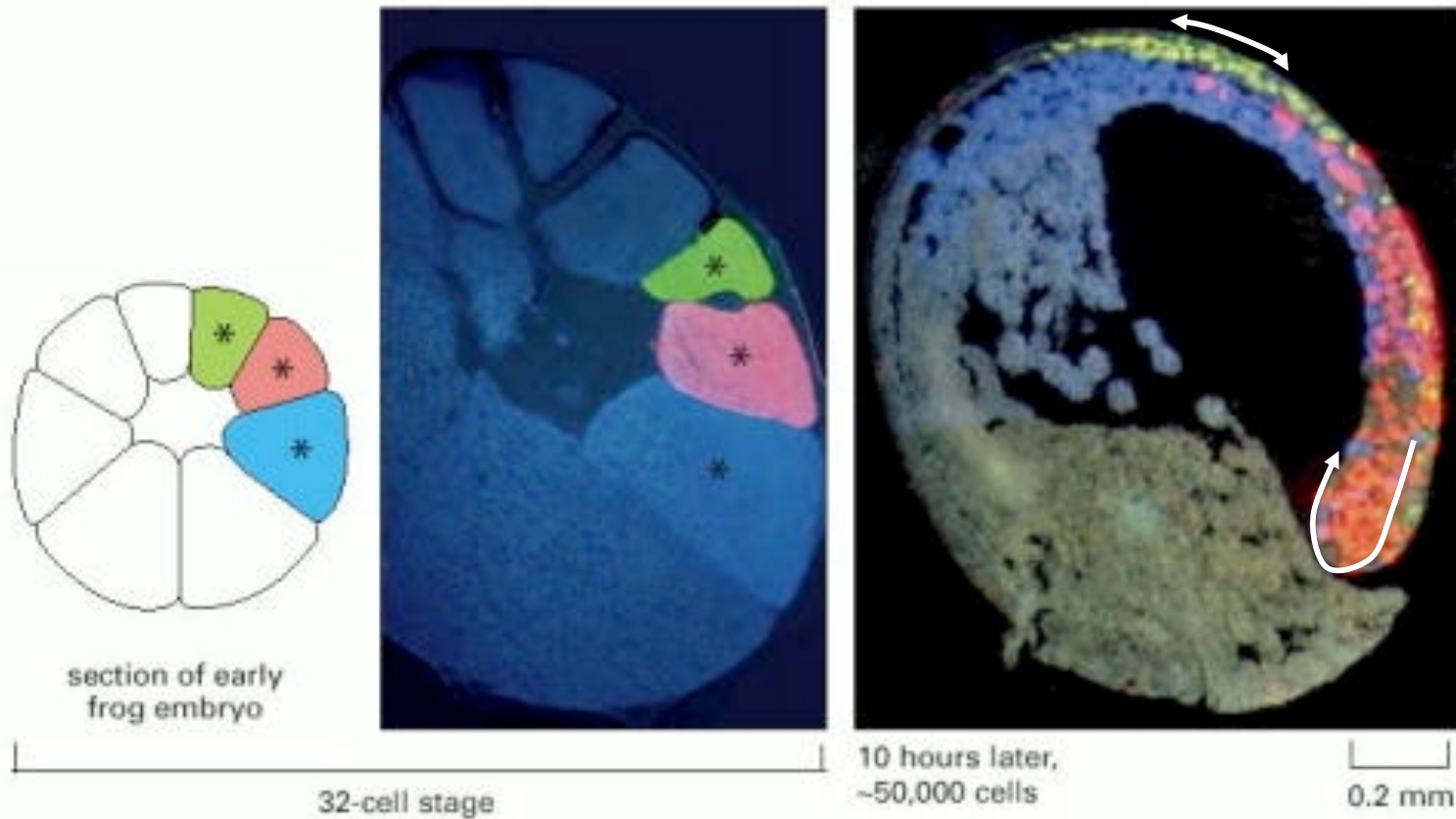




1- Introduction à la Biologie du Développement animal

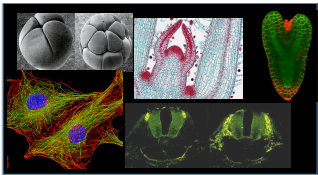
1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

Mise en évidence de déplacements cellulaires



✓ En cours de segmentation, des colorants fluorescents sont injectés dans des blastomères ciblés.

✓ 10h après, l'analyse de la localisation de la fluorescence permet de visualiser que les descendants des cellules marquées se sont déplacés.



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

Pour aller plus loin sur la gastrulation: Film "De l'oeuf à la grenouille" : 10 mn-16mn

Observez:

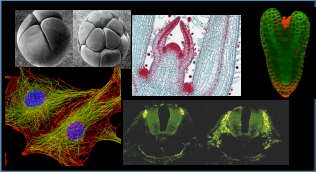
- ✓ La formation du blastopore et son évolution
- ✓ Les mouvements gastruléens visualisés grâce aux colorants vitaux
- ✓ La formation progressive d'une cavité, l'archentéron (futur tube digestif), au détriment du blastocoele

Lien vers la vidéo complète pour découvrir le développement du Xénope :

<https://www.youtube.com/watch?v=1NAt-OOSuKY&t=1s>

Lien vers le site Genially pour réviser les grandes étapes du développement du Xénope :

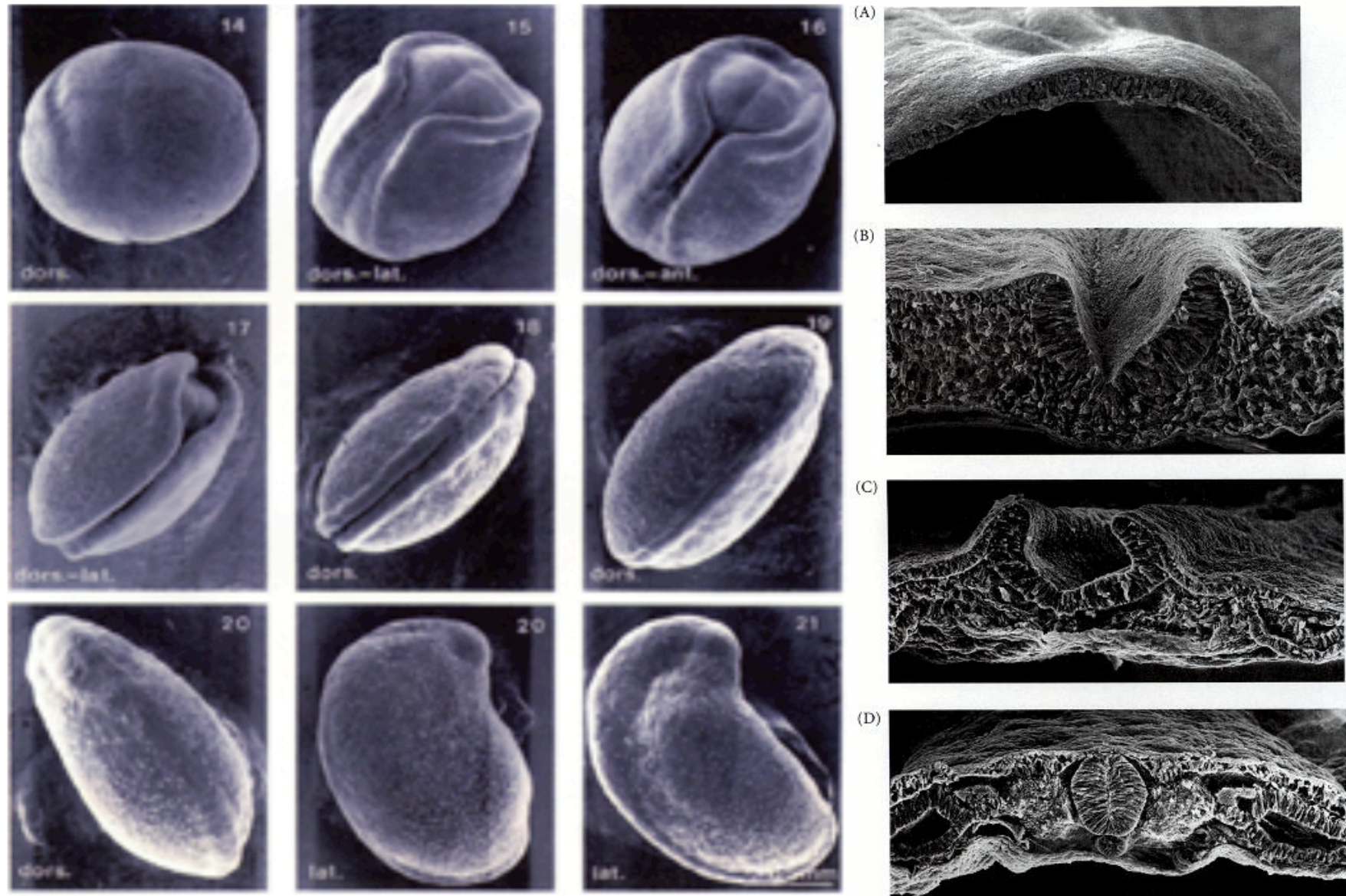
<https://view.genial.ly/5c0ce7510fd38247366d9537/developpement-xenope-l2>

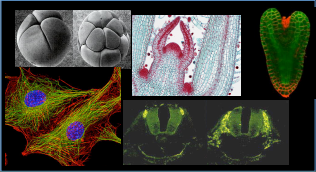


1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

Description succincte de la neurulation



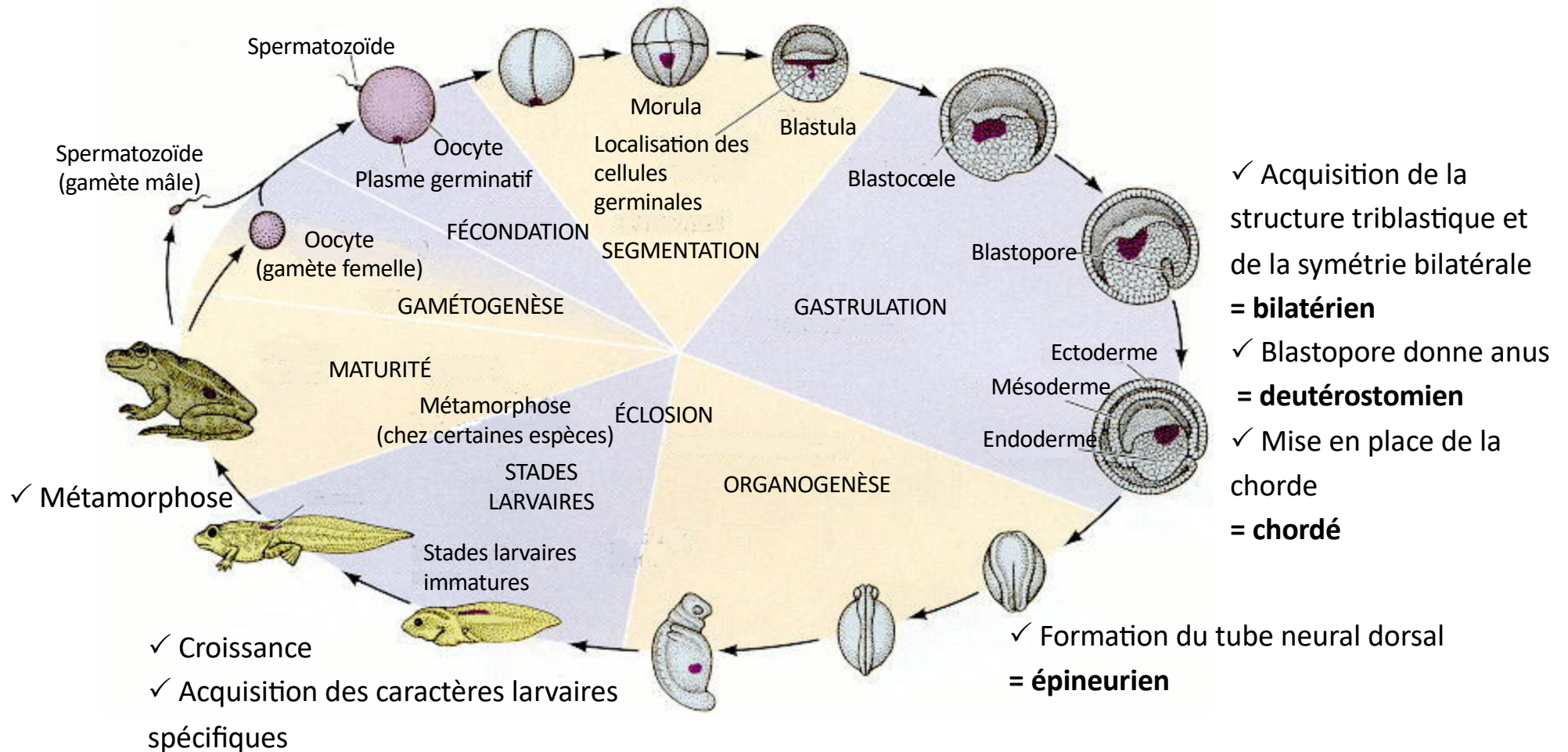


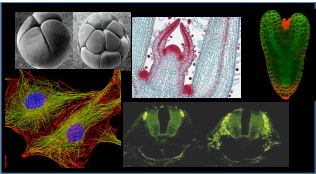
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.3- Les grandes étapes développementales d'un organisme modèle: le Xénope

Bilan

✓ Acquisition de la multicellularité = **métazoaire**





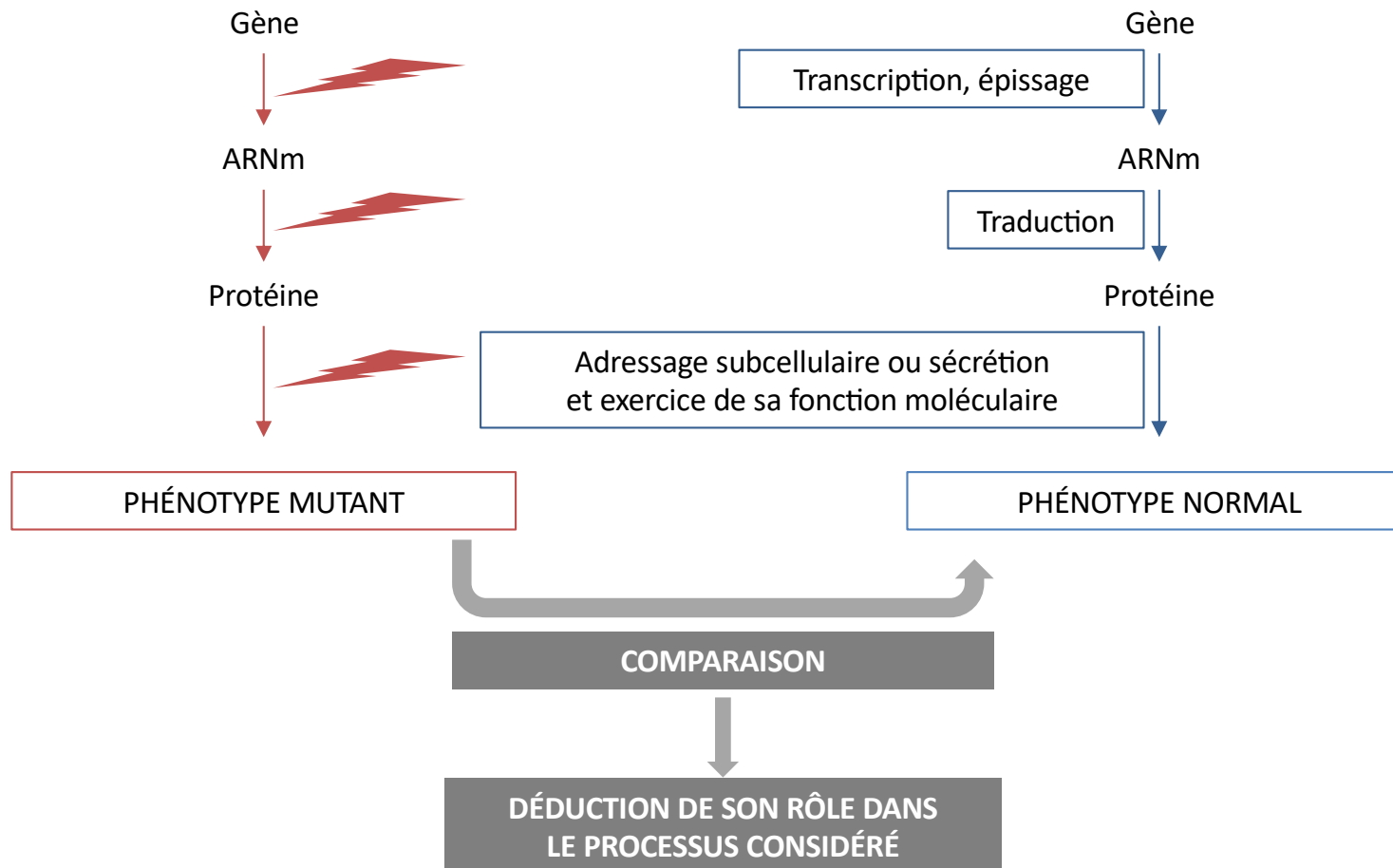
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

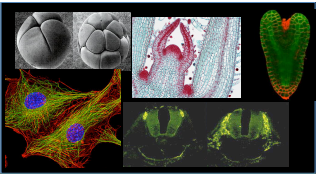
1.4- Principes et outils de base du gain et de la perte de fonction génique

Générer des gains ou pertes de fonction géniques pour comprendre les processus développementaux

On dispose d'un mutant d'un gène connu ou d'outils permettant de perturber son expression

Situation normale (contrôle négatif)





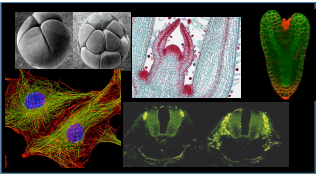
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.4- Principes et outils de base du gain et de la perte de fonction génique

Comment perturber l'expression d'un gène ?

- Inhiber totalement son expression : cela équivaut à réaliser une **perte de fonction totale**.
- Diminuer son expression : cela équivaut à réaliser une **perte de fonction partielle**.
- Augmenter son expression dans les cellules qui l'expriment : cela équivaut à réaliser un **gain de fonction**.
- Forcer son expression dans les cellules qui ne l'expriment pas en temps normal : cela équivaut à réaliser un **gain de fonction ectopique**.

Ce type d'analyse est réalisé sur des gènes dont on soupçonne qu'ils exercent une fonction dans un processus considéré à un stade développemental donné. **C'est souvent le profil d'expression du gène ou de la protéine qui permet d'émettre cette hypothèse initiale.**



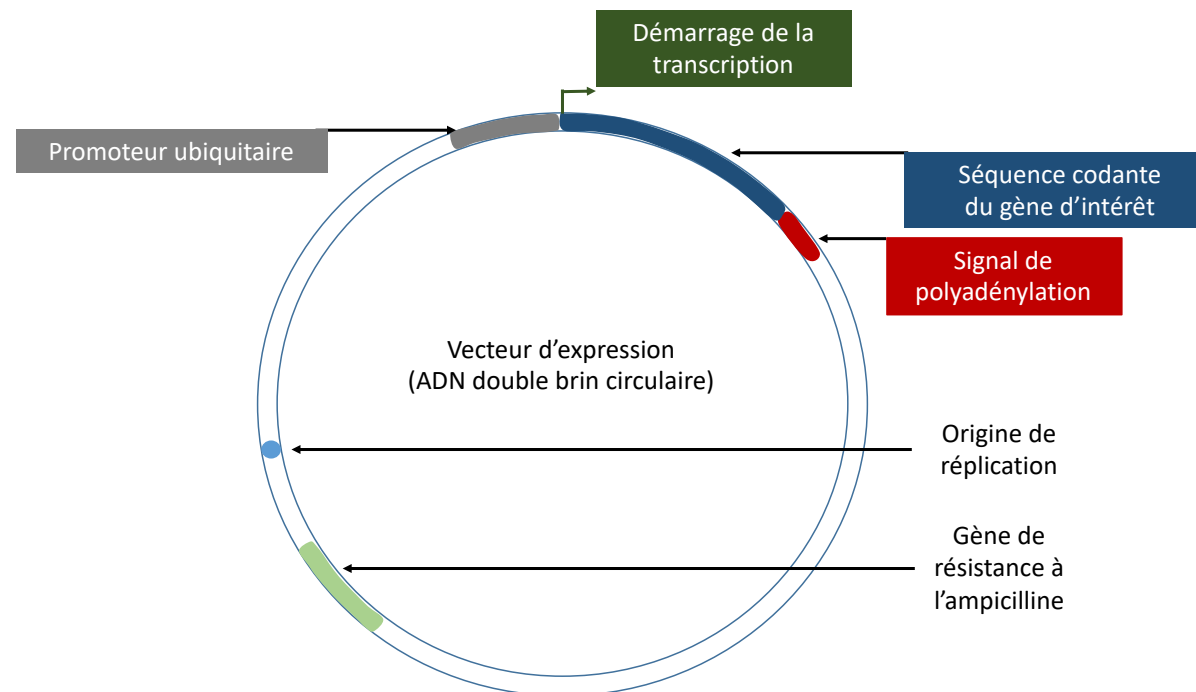
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

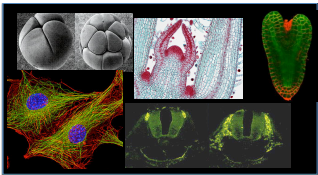
1.4- Principes et outils de base du gain et de la perte de fonction génique

Les outils du gain et de la perte de fonction

➤ Méthodes classiques de gain de fonction par surexpression :

- ❑ Introduction dans les cellules d'un vecteur d'expression (un plasmide par exemple) contenant l'ADNc du gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur.
- ❑ Introduction dans les cellules de l'ARNm codant le gène d'intérêt.





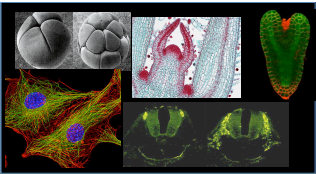
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.4- Principes et outils de base du gain et de la perte de fonction génique

Les outils du gain et de la perte de fonction

➤ **Méthodes classiques de perte de fonction :**

- MODIFICATION DIRECTE DU GÉNOME (mutation d'un gène d'intérêt).
- INHIBITION DE LA TRADUCTION DE LA PROTÉINE OU DÉGRADATION DE L'ARNm
 - Introduction dans les cellules ou l'embryon d'ARN antisens qui, par hybridation avec l'ARNm du gène ciblé vont empêcher sa traduction ou entraîner sa dégradation (perte de fonction partielle).
- BLOCAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA PROTÉINE
 - Anticorps « bloquants » qui, par interaction spécifique avec la protéine ciblée, l'empêcheront d'exercer sa fonction.
 - Inhibiteurs pharmacologiques de la protéine ciblée.



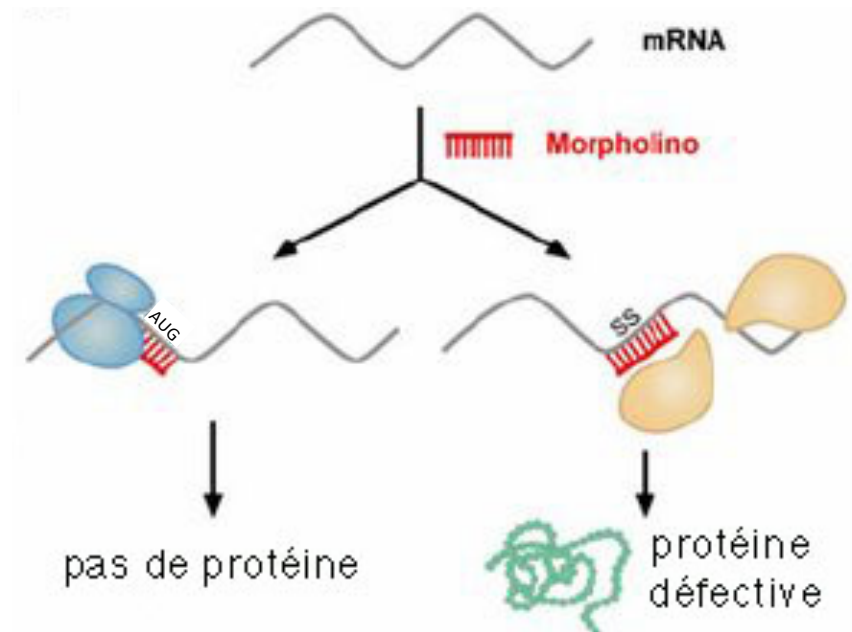
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

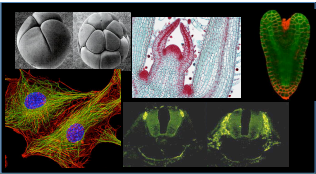
1.4- Principes et outils de base du gain et de la perte de fonction génique

Principe de fonctionnement des oligonucléotides antisens

- ARN « interférents » : ARN antisens pouvant être codés par un vecteur d'expression.
- Morpholinos : oligonucléotides de synthèse chimiquement modifiés.

Un oligonucléotide anti-sens (Morpholino ou ARN interférent) peut engendrer la dégradation de l'ARNm de son gène cible ou l'inhibition de sa traduction.

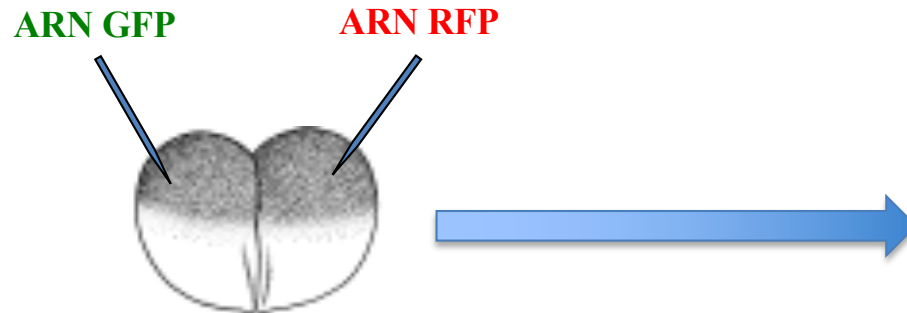




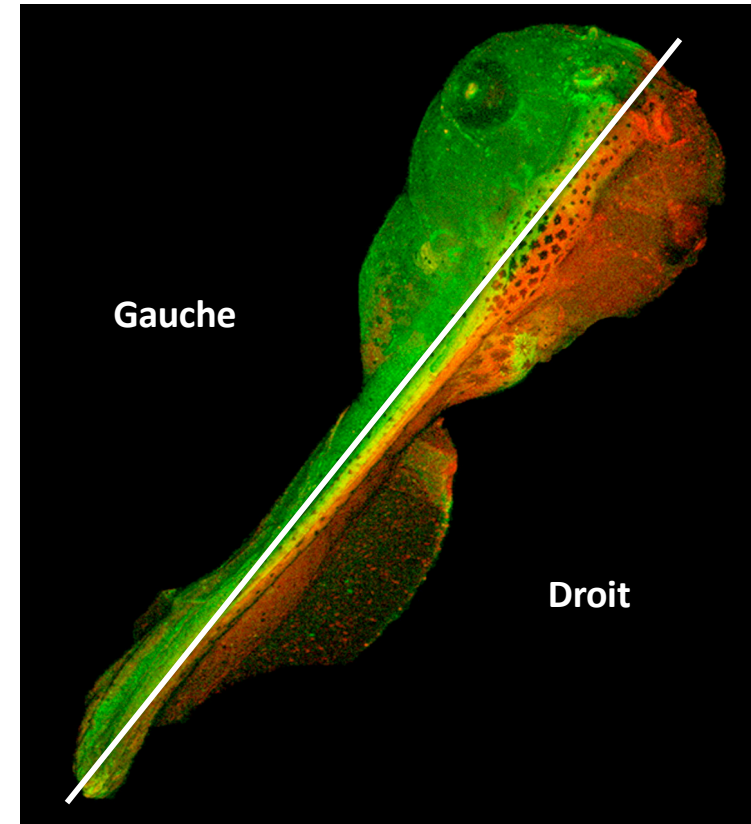
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.5- Les techniques de perturbation génique

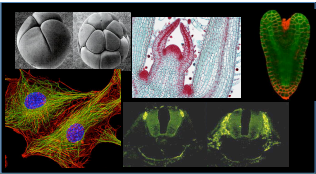
Comment introduire du matériel génétique exogène : la microinjection



- Injection possible d'ARNm (surexpression d'une protéine), de morpholinos (inhibition de l'expression de la protéine ciblée) ou d'anticorps bloquants (inhibition de l'activité de la protéine ciblée).
- Seules les cellules filles de la cellule injectée auront une expression génique perturbée.
- Si on n'injecte qu'un seul blastomère, le côté non injecté peut servir de contrôle à condition de pouvoir identifier le côté injecté (co-injection des ARNm GFP ou β -Gal).



La première division délimite le côté droit et gauche de l'embryon de xénope.

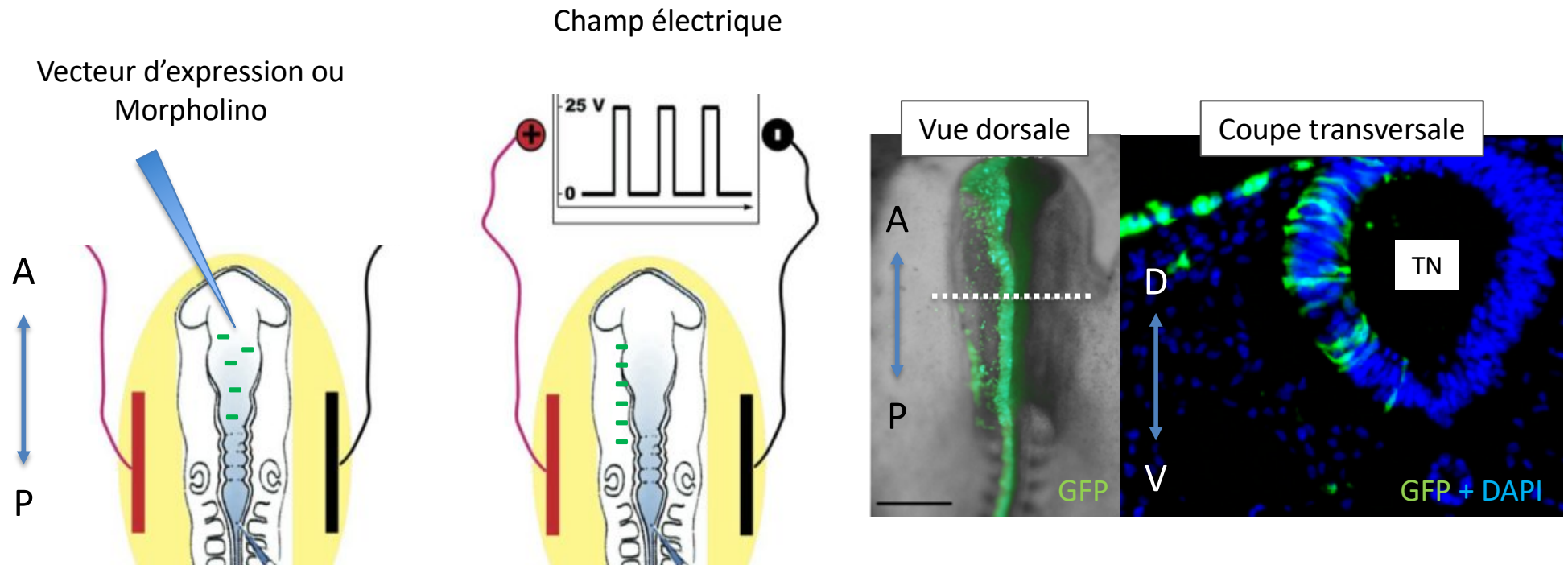


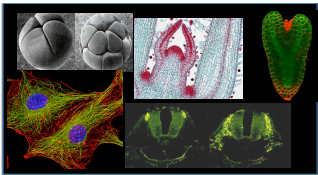
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.5- Les techniques de perturbation génique

Comment introduire du matériel génétique exogène : l'électroporation

- ✓ Technique de TRANSFECTION pouvant être utilisée *in vivo*.





1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.6- Principes de l'analyse phénotypique

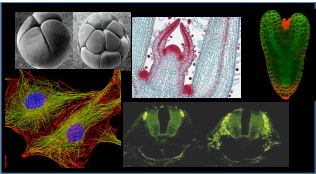
Comparer ses résultats relativement à des contrôles négatifs/positifs

- ✓ Une expérience comporte TOUJOURS un contrôle négatif : condition de référence (non traitée, non perturbée...) à laquelle les conditions expérimentales seront comparées.
- ✓ Dans la mesure du possible, on ajoute un contrôle positif : test d'un paramètre dont on sait qu'il est affecté par le traitement/la perturbation effectué et qui permet de vérifier que le traitement/la perturbation a bien fonctionné).

Exemple : Vous vous intéressez au rôle d'une voie de signalisation (par exemple la voie Wnt) dans le contrôle de la prolifération des progéniteurs de la rétine.

Stratégie expérimentale choisie : bloquer la voie en traitant vos embryons avec une drogue qui inhibe la transduction du signal puis analyser le phénotype dans la rétine.

- Lot d'embryon N°1 : NON TRAITÉS À LA DROGUE. C'est la référence, c'est à dire le contrôle négatif.
- Lot d'embryon N°2 : TRAITÉS À LA DROGUE. C'est votre condition expérimentale.



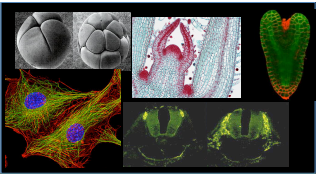
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.6- Principes de l'analyse phénotypique

Comparer ses résultats relativement à des contrôles négatifs/positifs

Problème : *Imaginez que vous n'observiez aucun phénotype. Pouvez-vous conclure que la voie Wnt n'a vraiment aucun effet sur la prolifération de vos cellules ? Pas sans avoir préalablement vérifié que votre drogue fonctionnait... Par exemple, en testant l'expression d'une cible transcriptionnelle de la voie Wnt (gène dont l'expression est censée diminuer quand la voie est effectivement inhibée)*

- Lot d'embryon N°3 : TRAITÉS À LA DROGUE et test de l'expression d'une cible transcriptionnelle de la voie Wnt (gène dont l'expression est censée diminuer quand la voie est effectivement inhibée) = C'est votre contrôle positif.



1- Introduction à la Biologie du Développement animal

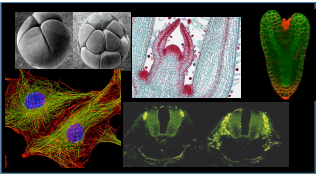
1.6- Principes de l'analyse phénotypique

Comparer ses résultats relativement à des contrôles négatifs/positifs

- ❑ Macroscopiquement (observation directe d'un phénotype)
 - Observation directe à l'œil nu ou sous loupe binoculaire pour les espèces modèles à développement externe (ex. Xénope; poisson)
 - Dissection ou imagerie non invasive (ex. échographie) pour les espèces à développement interne

Analyse de la pigmentation après perte de fonction partielle d'un gène impliqués dans la formation des mélanocytes.





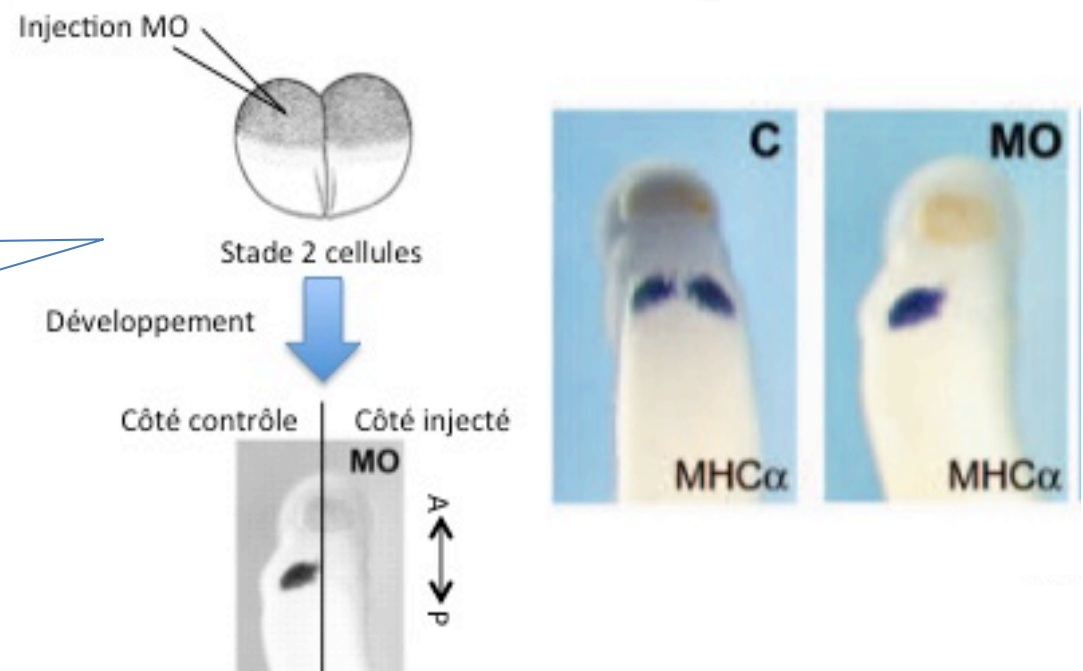
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

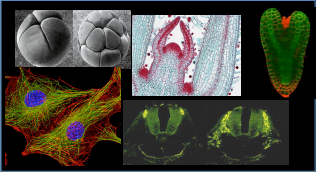
1.6- Principes de l'analyse phénotypique

Identifier un phénotype après un gain ou une perte de fonction génique

- ❑ Analyses histologiques sur coupes
- ❑ Analyses sur extraits ARN/protéiques de l'expression de **marqueurs** par PCR/WB.
- ❑ Analyses sur coupes ou *in toto* de l'expression de **marqueurs** par hybridation *in situ*, immunofluorescence.
 - Marqueurs de cellules en prolifération
 - Marqueurs de détermination/différenciation
 - Marqueur de cellule en migration

Analyse d'un marqueur de cardiomyocytes par hybridation *in situ* après perte de fonction partielle d'un gène impliqué dans le développement du cœur (gène *myocardin*).



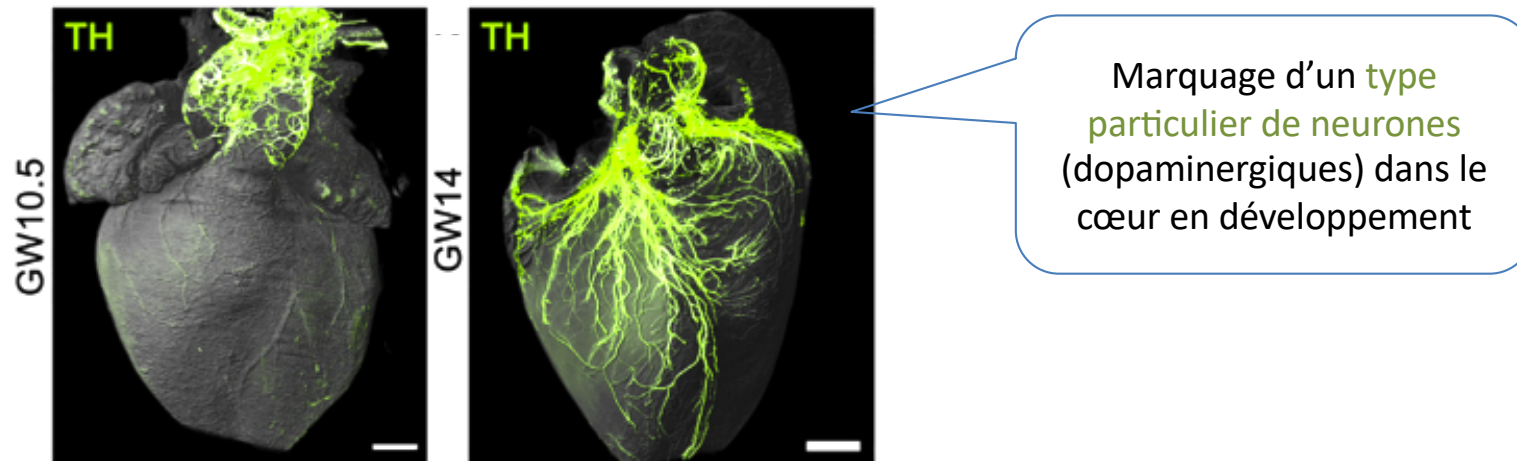
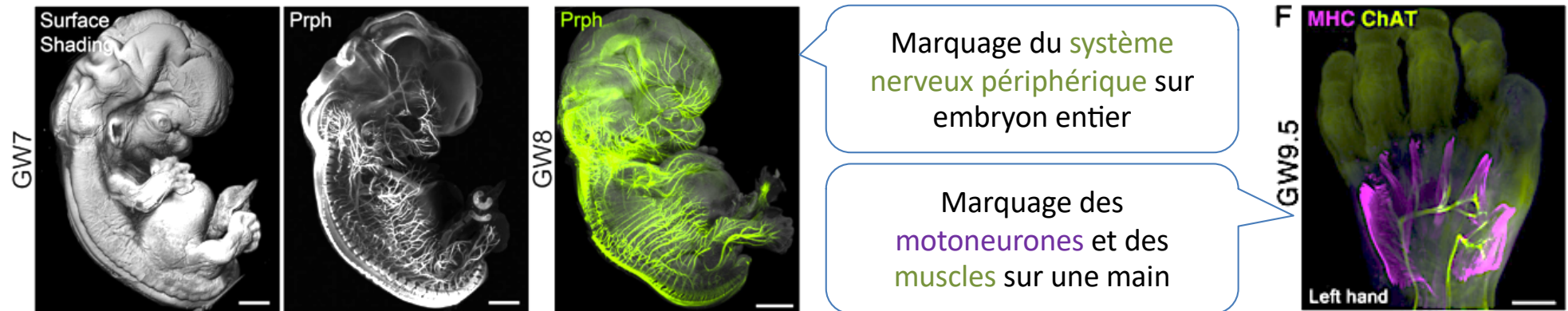


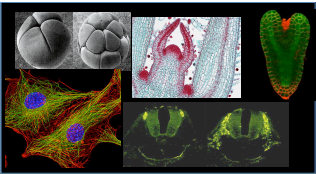
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.6- Principes de l'analyse phénotypique

Identifier un phénotype après un gain ou une perte de fonction génique

- ❑ Exemple de marqueurs (embryons humains après immunofluorescence et reconstruction 3D)





1- Introduction à la Biologie du Développement animal

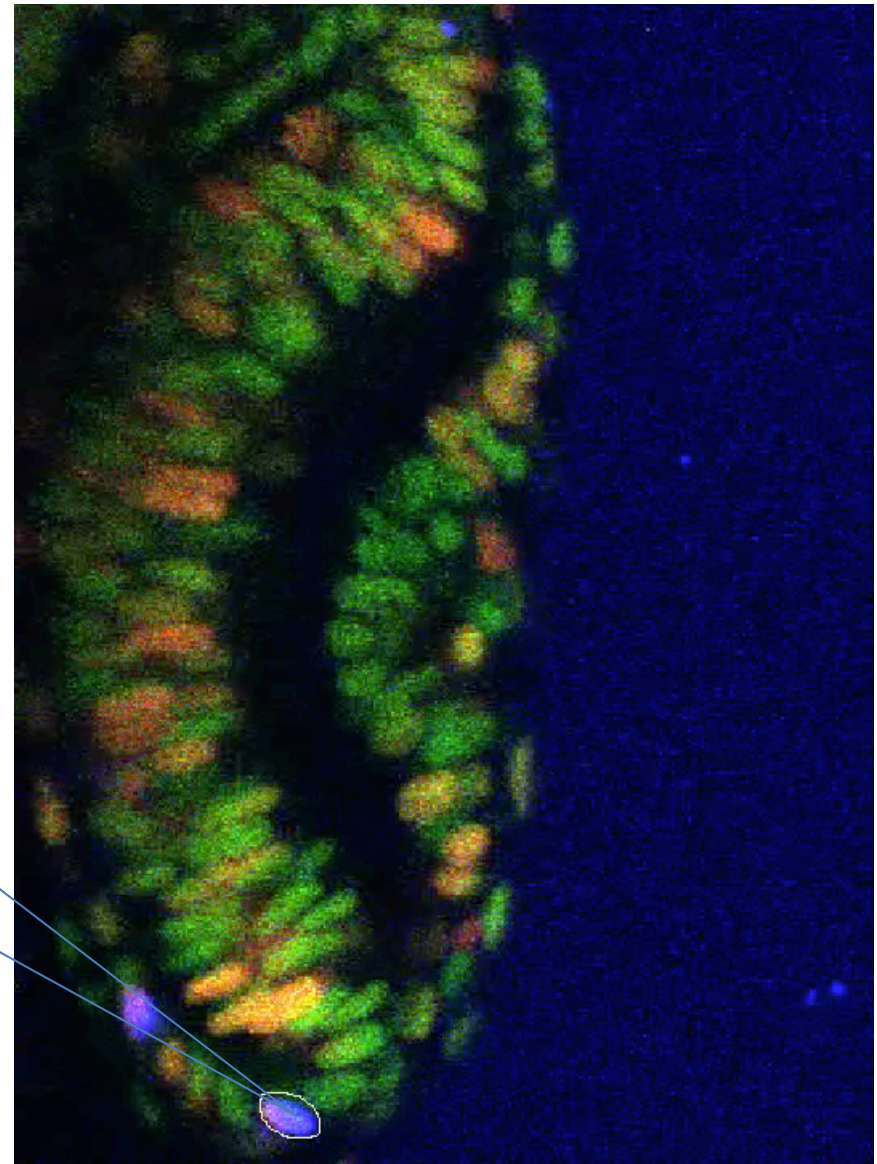
1.6- Principes de l'analyse phénotypique

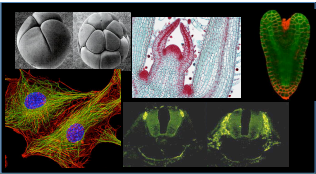
Identifier un phénotype après un gain ou une perte de fonction génique

- ❑ Possibilité d'utiliser des animaux transgéniques exprimant une **protéine rapportrice** (β -Gal, GFP...) dans le tissu/type cellulaire d'intérêt.
- ❑ Visualisation de la protéine rapportrice sur coupe ou en live imaging sur embryons suffisamment transparents.

Suivi d'une **cellule marquée** au cours de la morphogenèse de la rétine

TD1 : système rapporteur pour étudier la voie Wnt





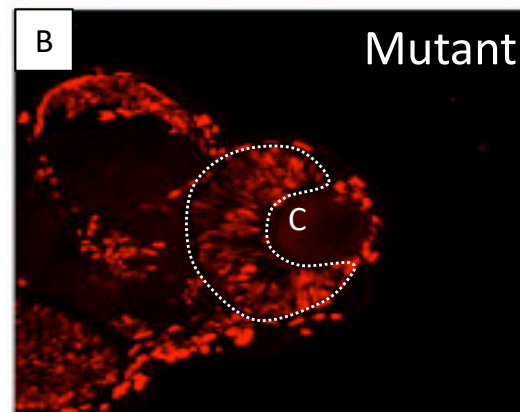
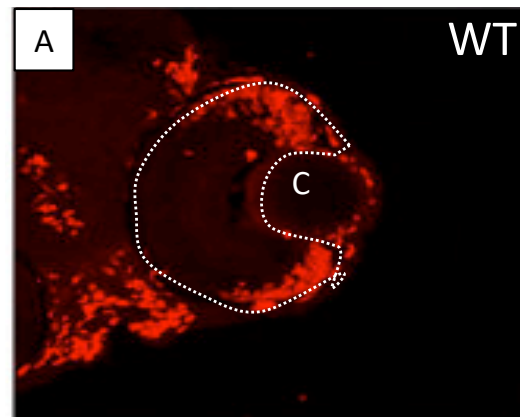
1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.6- Principes de l'analyse phénotypique

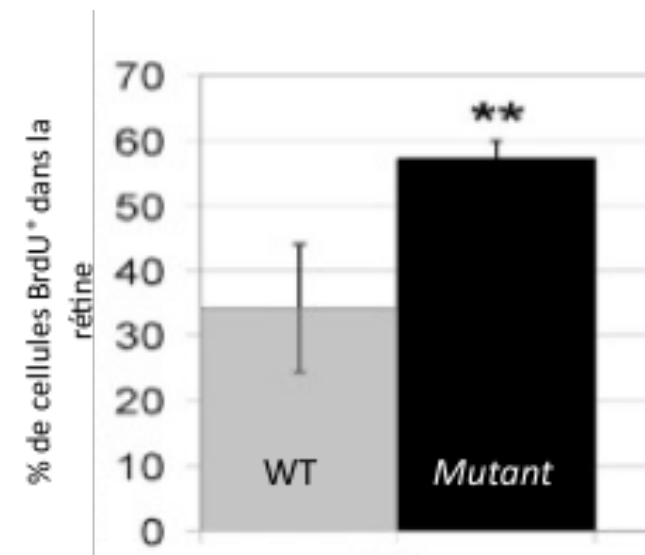
Identifier un phénotype après un gain ou une perte de fonction génique

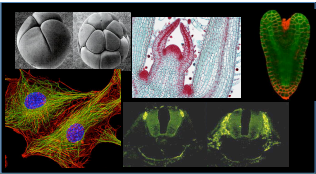
- La bromodéoxyuridine est un analogue de la thymidine.
- Fournie à l'embryon (injection, bain...), elle s'incorpore à l'ADN des cellules au cours de la réplication de l'ADN (phase S). On peut ensuite détecter les cellules marquées en immunofluorescence avec un anticorps anti-BrdU.

Marquage des **cellules en phase S** dans la rétine d'un embryon de poisson sauvage ou mutant.



C





1- Introduction à la Biologie du Développement animal

1.6- Principes de l'analyse phénotypique

Les grandes étapes de l'analyse phénotypique après un gain ou une perte de fonction génique

- ❑ **RECENSER** et **QUALIFIER** les défauts aux échelles considérées (cellulaire, tissulaire ou macroscopique) par comparaison avec le contrôle.
- ❑ **QUANTIFIER** ces défauts par rapport à la situation contrôle (on quantifie le pourcentage d'embryon présentant le phénotype macroscopique observé, une expression, un nombre de cellules exprimant tel ou tel marqueur, la taille d'une structure, ...).
- ❑ **CONCLURE** sur le rôle du gène dans le processus et à l'échelle considérés.

Les défauts décrits permettent de conclure si la fonction du gène est **NÉCESSAIRE** (perte de fonction) et/ou **SUFFISANTE** (gain de fonction) pour le processus considéré. Ces mêmes termes s'appliquent en conclusion d'expériences d'ablation ou de greffe de cellules ou tissus.