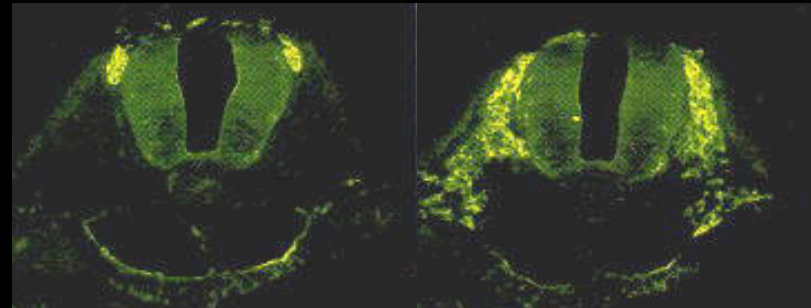


Biologie cellulaire et développement L2S4

Cours 4 - Morgane Locker



Morgane Locker

UMR 9197 NeuroPSI

Campus CEA Saclay, 151 route de la Rotonde

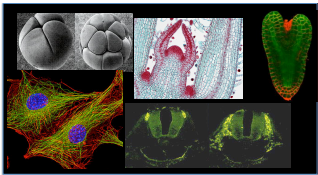
Bâtiment 151, 1er étage, bureau 1015

01-62-82-63-82

Morgane.locker@universite-paris-saclay.fr

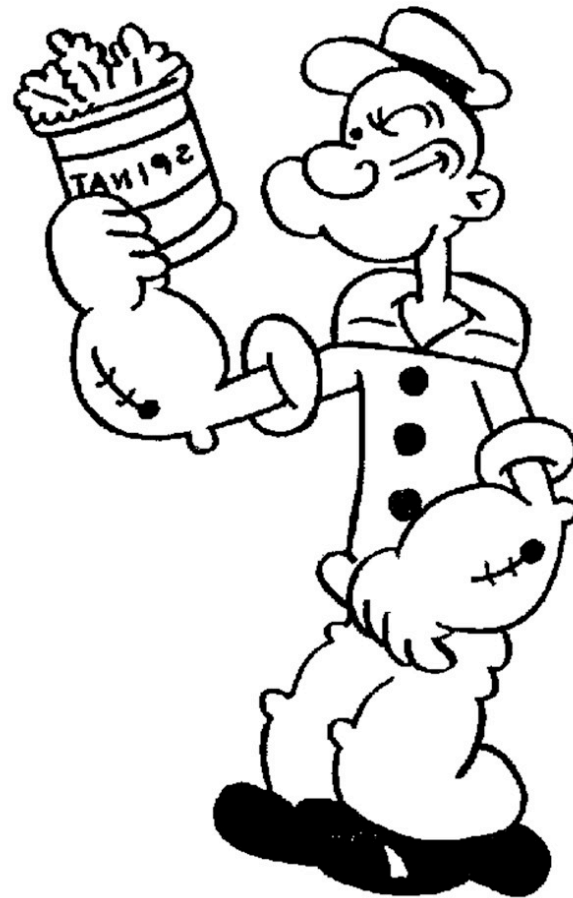
université
PARIS-SACLAY

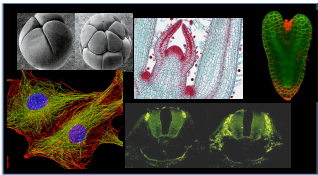
NeuroPSI
PARIS-SACLAY INSTITUTE OF NEUROSCIENCE



QUESTION DU JOUR

Comment une cellule apprend-elle qu'elle deviendra une cellule musculaire et comment le devient-elle ?





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

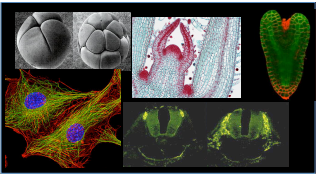
- 2.1- Définition de l'induction
- 2.2- Inductions embryonnaires précoces dans l'embryon de Xénope
- 2.3- Un exemple d'induction tardive : la régionalisation des somites

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



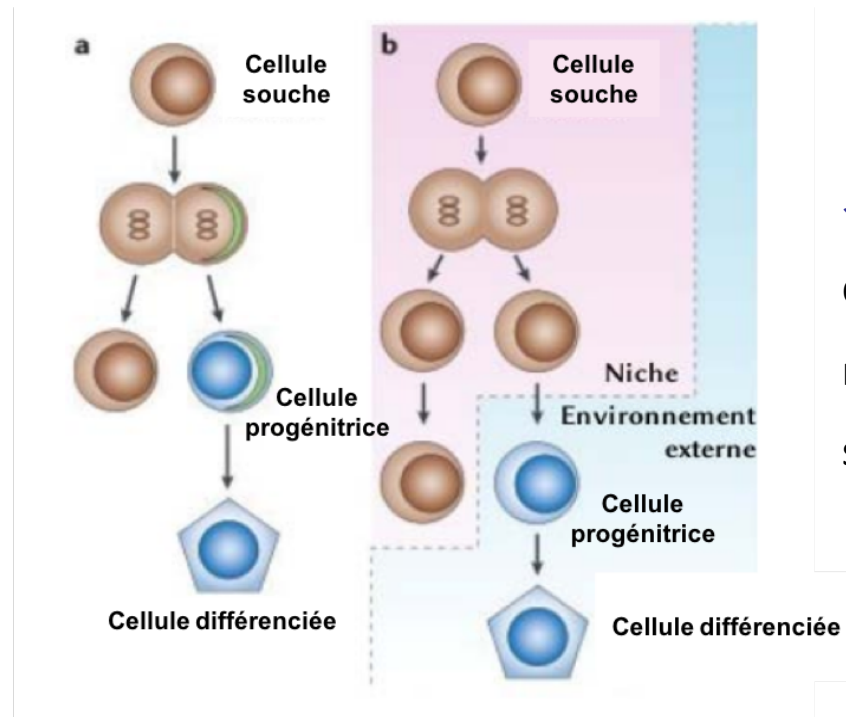
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

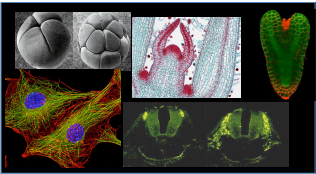
Rappels: définition d'une cellule souche et de la différenciation

✓ **Cellules souches** = cellules indifférenciées ayant la double capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires différents.

✓ **Deux possibilités lors d'une division** = générer 2 cellules souches par division symétrique ou se diviser asymétriquement pour générer 1 cellule souche et 1 progéniteur qui s'engagera irréversiblement dans une voie de différenciation.



✓ **Différenciation**: Ensemble des processus qui permettent à une cellule d'acquies, de maintenir et de moduler ses fonctions spécialisées

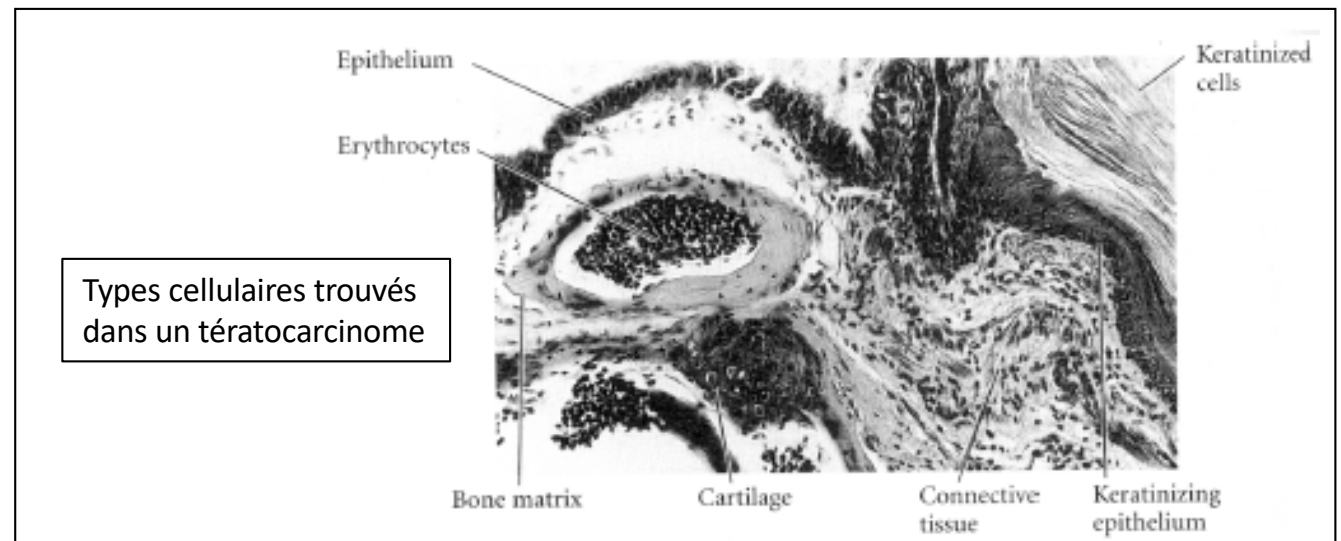


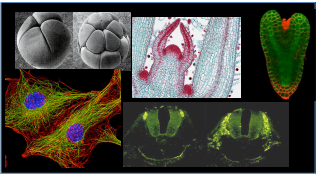
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Historique de la découverte des cellules souches embryonnaires: le tératocarcinome

- ✓ Une tumeur des gonades qualifiée d'« embryon désorganisé », présentant des dérivés différenciés de tous les lignages.
- ✓ Présence de cellules indifférenciées dans la tumeur capables de régénérer clonalement un tératocarcinome après transplantation.

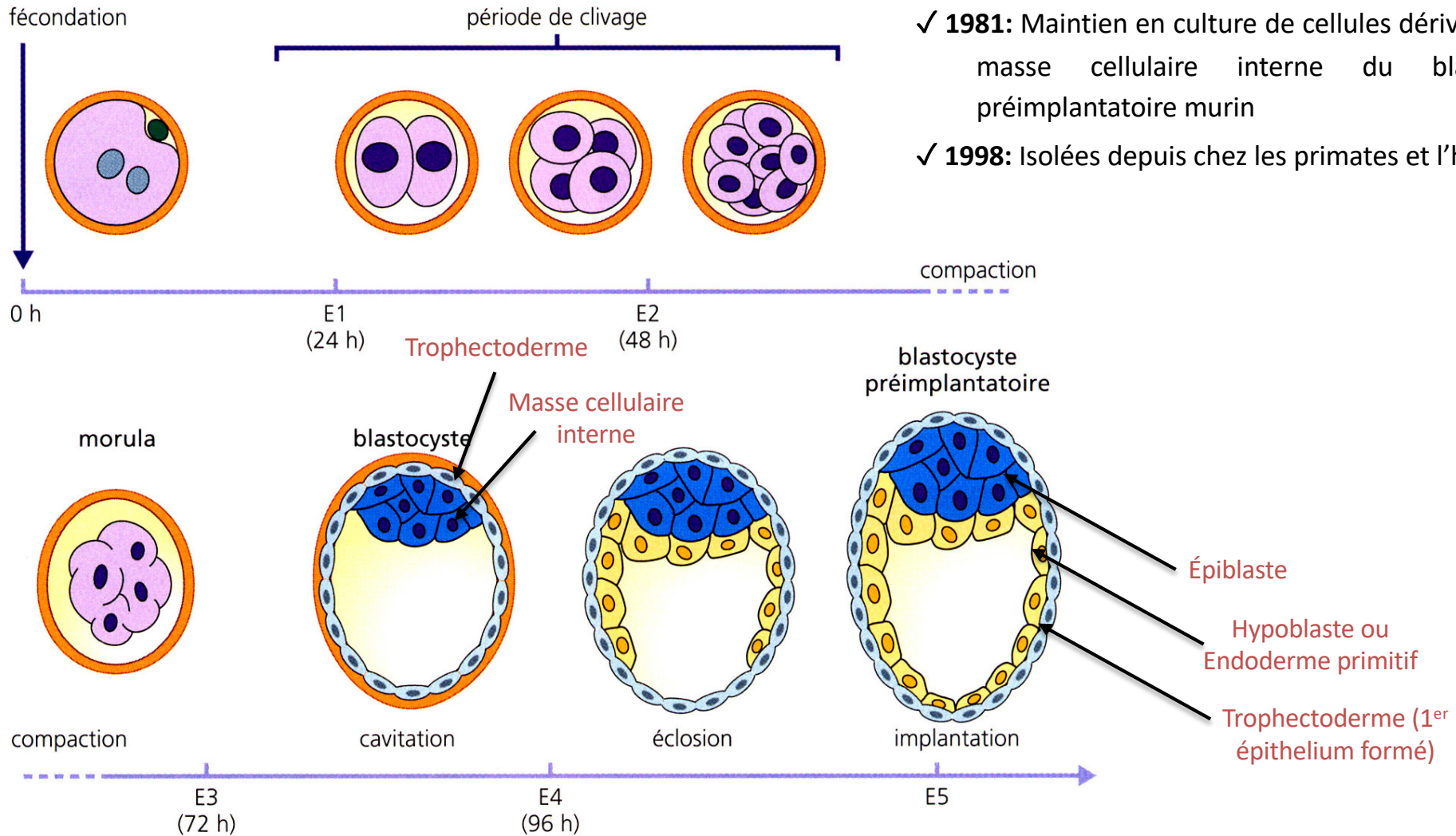




4- Cellules souches et différenciation cellulaire

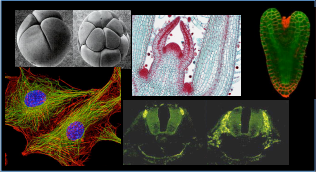
4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Les cellules souches embryonnaires pluripotentes



✓ **1981**: Maintien en culture de cellules dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste préimplantatoire murin

✓ **1998**: Isolées depuis chez les primates et l'homme



4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

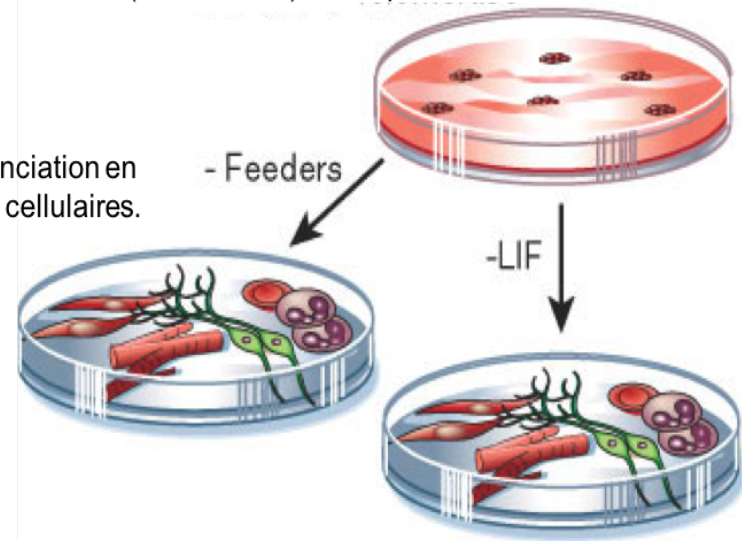
Propriétés in vitro des cellules souches embryonnaires pluripotentes

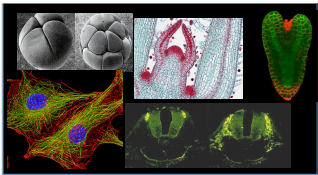
- ✓ Prolifération prolongée dans un état indifférencié (auto-renouvellement) sur assise de cellules nourricières ou en présence de LIF ("Leukemia Inhibitory Factor").
- ✓ Capacité à différencier en tout dérivé d'origine méso-, ecto- ou endodermique (ne génèrent pas les annexes embryonnaires).
- ✓ Nommées cellules ES pour "Embryonic Stem cells ».

Propriétés *in vitro* des cellules ES ou EC

1 - Maintien à l'état indifférencié sur assise de cellules nourricières (« Feeders ») ou en présence de LIF.

2 – Différenciation en tous types cellulaires.





4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Propriétés in vivo des cellules souches embryonnaires pluripotentes

Propriétés *in vivo* des cellules ES ou EC

✓ ES injectées à des souris adultes:

Formation de tératocarcinomes

✓ ES réimplantées dans un

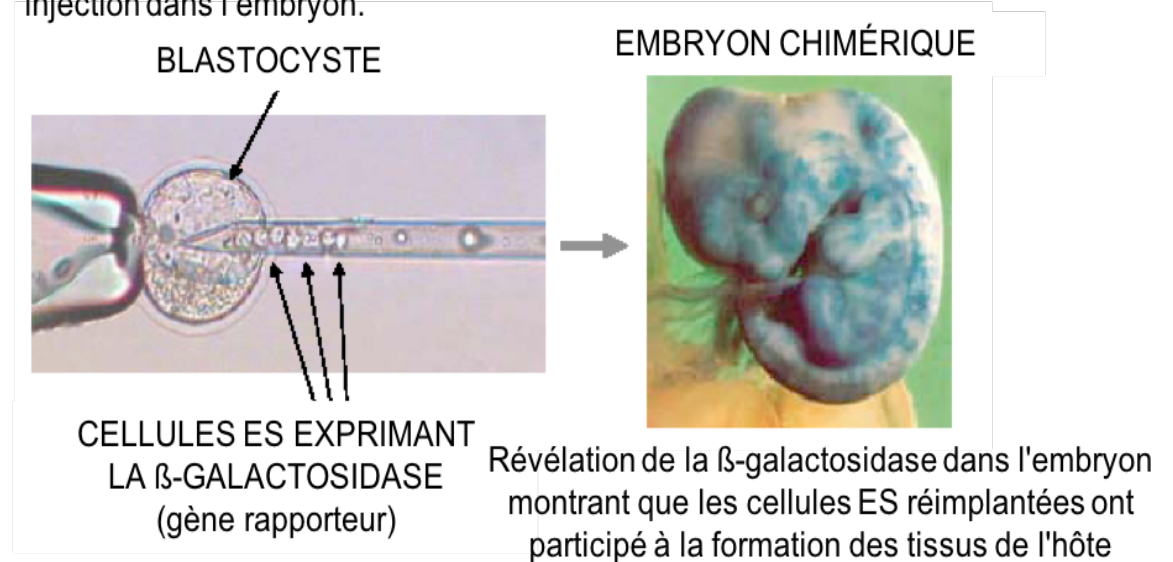
blastocyste:

Embryon chimérique où les ES

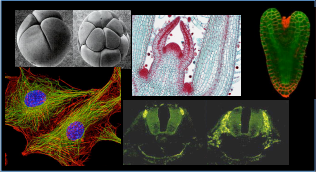
participent à tous les tissus, y compris

la lignée germinale

1 – Participation à la genèse des types cellulaires adultes après injection dans l'embryon.



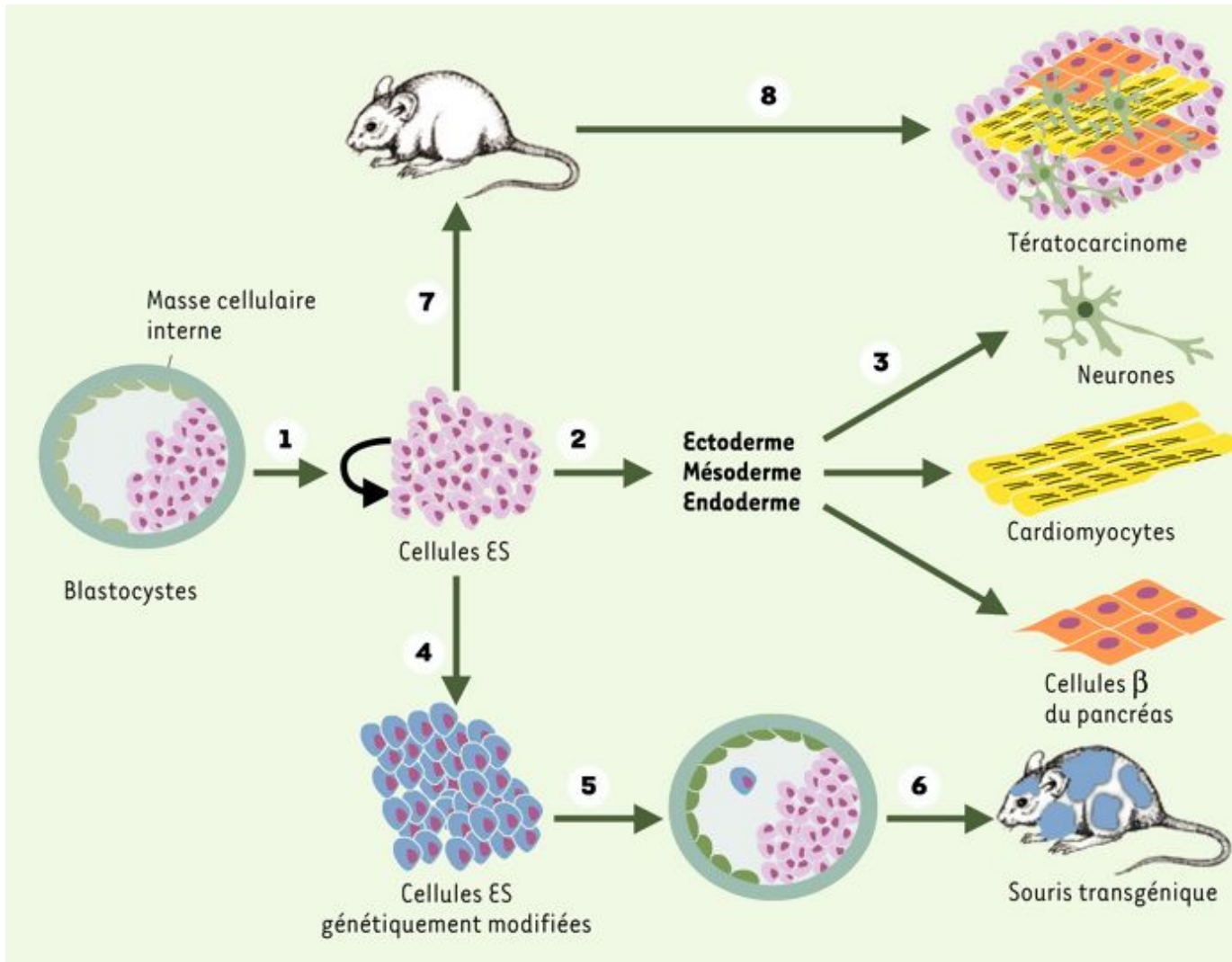
2 – Formation de tératocarcinomes après réimplantation dans un organisme adulte.



4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Des cellules qui ont révolutionné la génétique du développement chez les mammifères...



PRIX NOBEL 2007

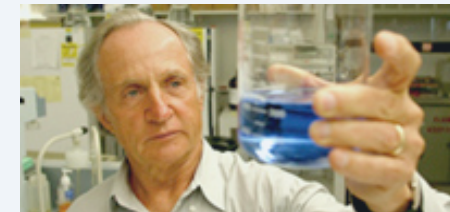
Isolement des ES

Martin Evans



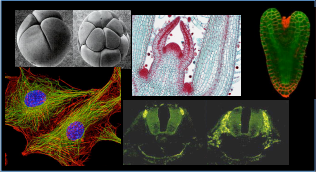
Recombinaison homologue

Mario Capecchi



Oliver Smithies





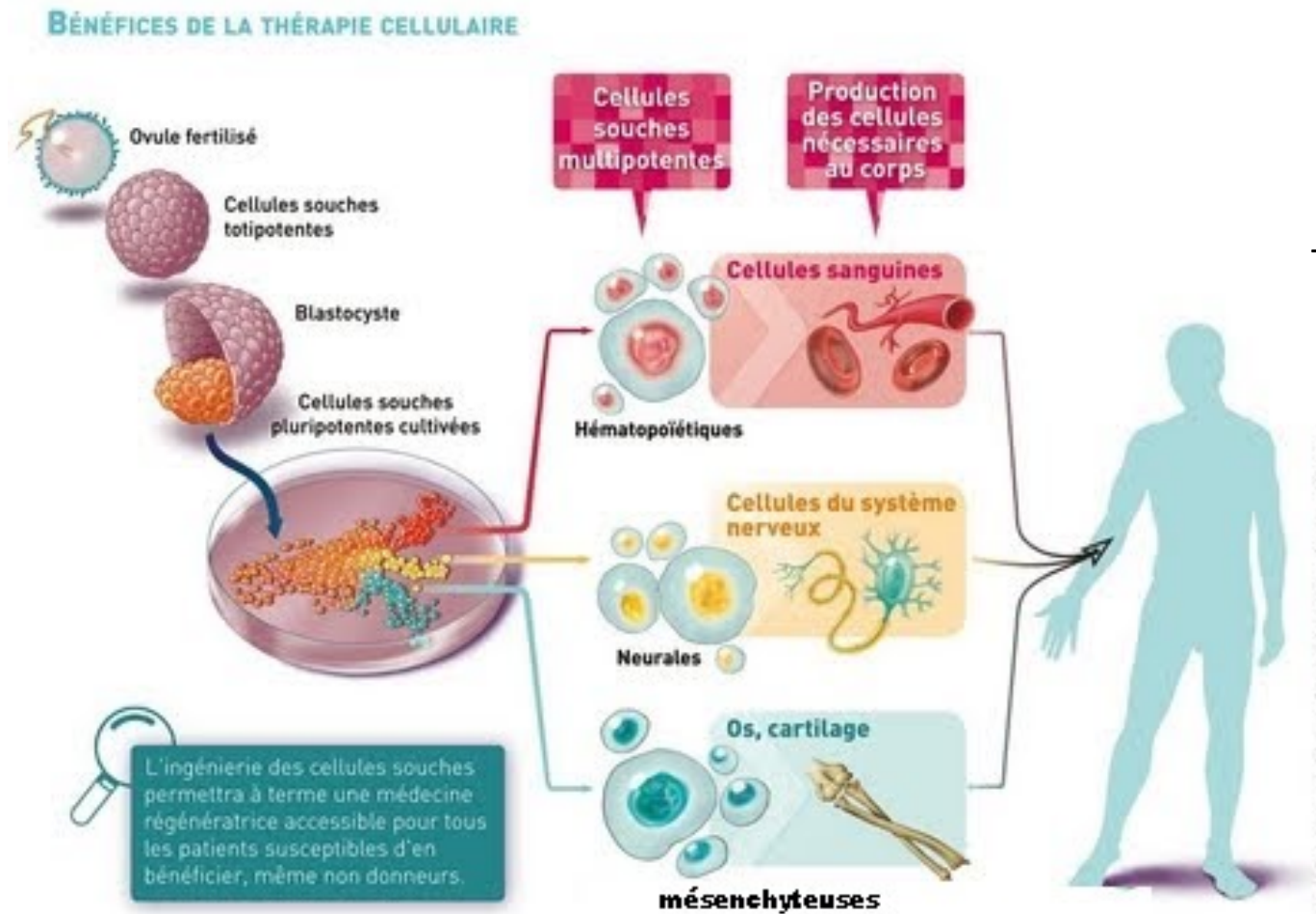
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

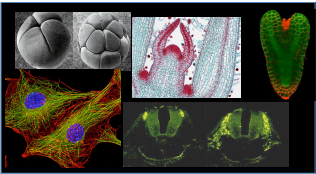
4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

...Et révolutionneront vraisemblablement la thérapie cellulaire

✓ **Principales limites:**

- ÉTHIQUES
- REJET DE GREFFE
- POTENTIEL ONCOGÉNIQUE

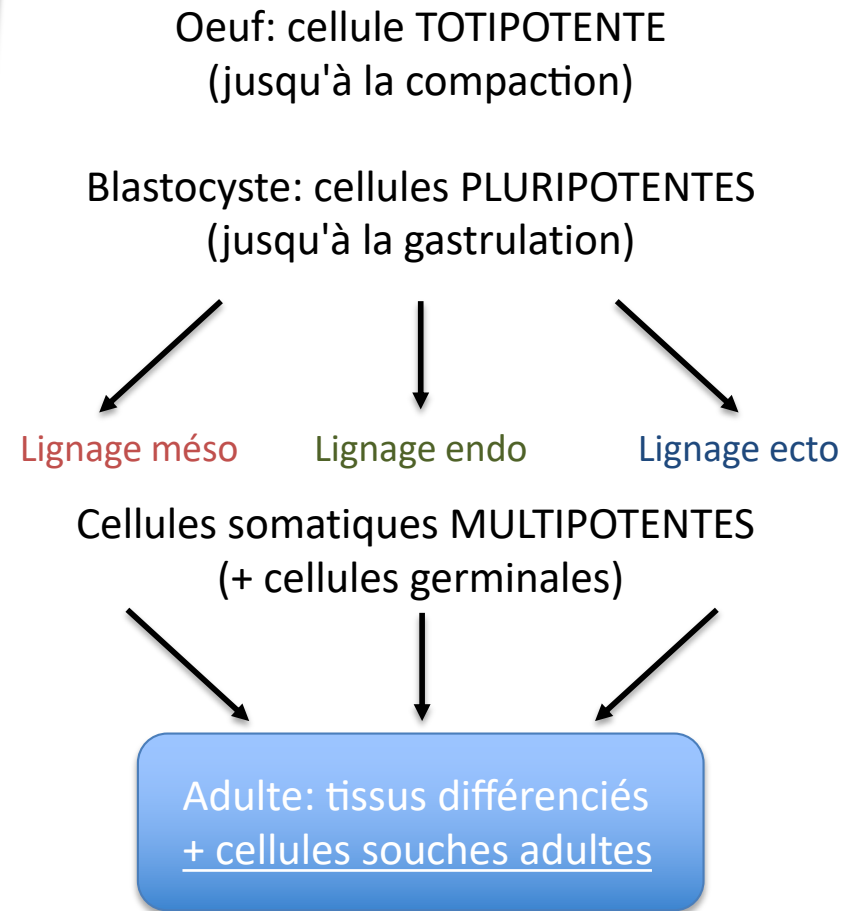
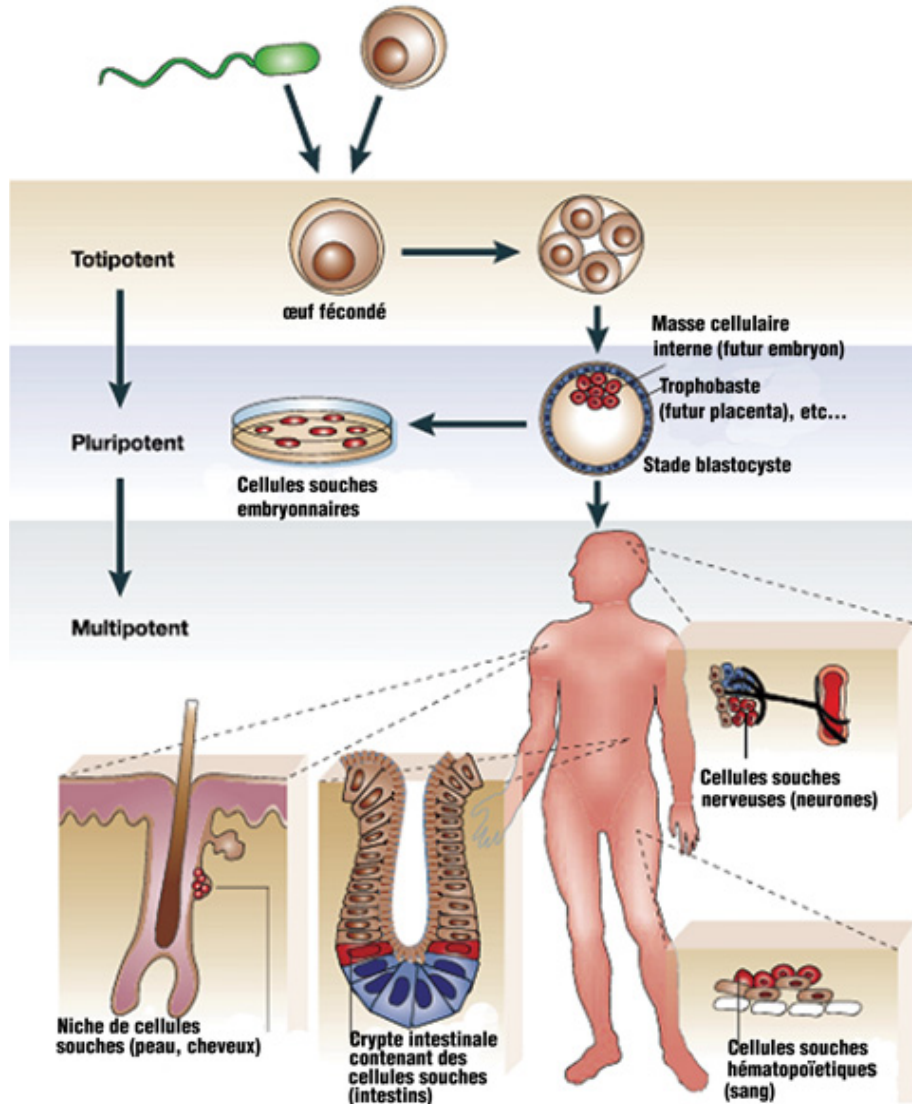


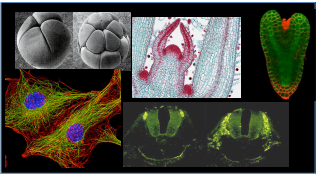


4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Cellules souches et développement





4- Cellules souches et différenciation cellulaire

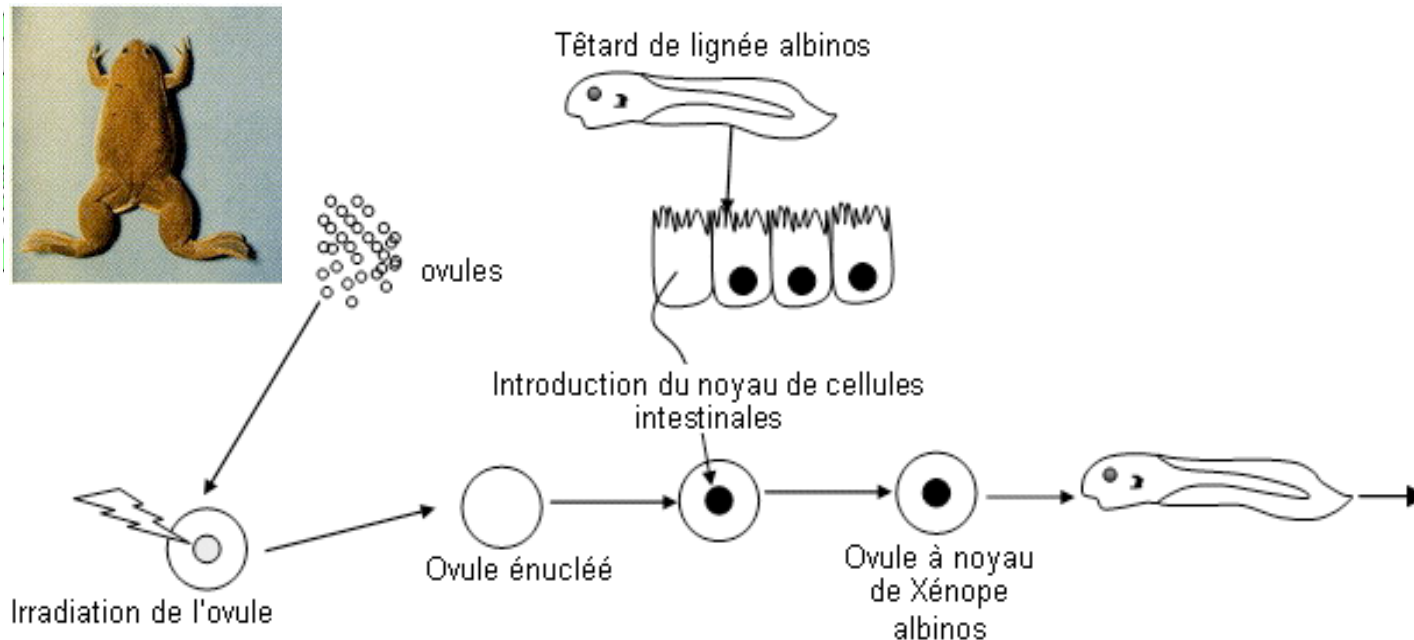
4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

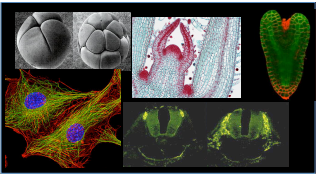
Une cellule différenciée peut-elle revenir en arrière, i.e. redevenir pluripotente?

✓ OUI! Par un processus appelé **reprogrammation cellulaire**.

✓ Phénomène mis en évidence par John Gurdon dans les années 60s (prix Nobel 2012).

✓ La question à l'époque était de savoir si le noyau d'une cellule différenciée contenait encore toute l'information génétique!!!



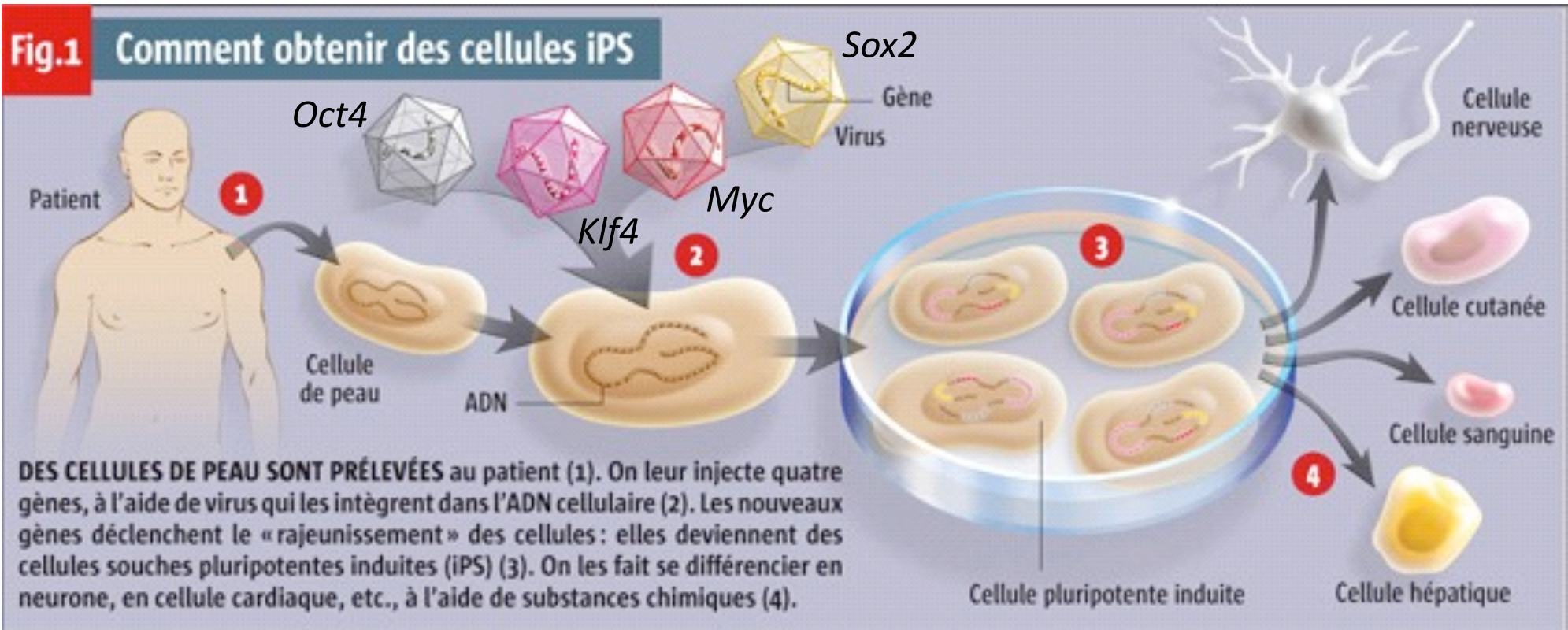


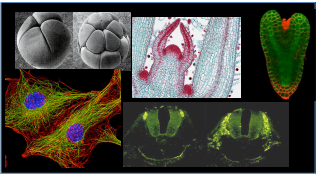
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Une cellule différenciée peut-elle revenir en arrière, i.e. redevenir pluripotente?

✓ Environ 40 ans plus tard, Shinya Yamanaka (prix nobel 2012) montre qu'on peut obtenir des cellules pluripotentes à partir de cellules différenciées *via* l'expression forcée de seulement 4 facteurs de transcription clefs (OKMS)= Induced Pluripotent Stem cells.

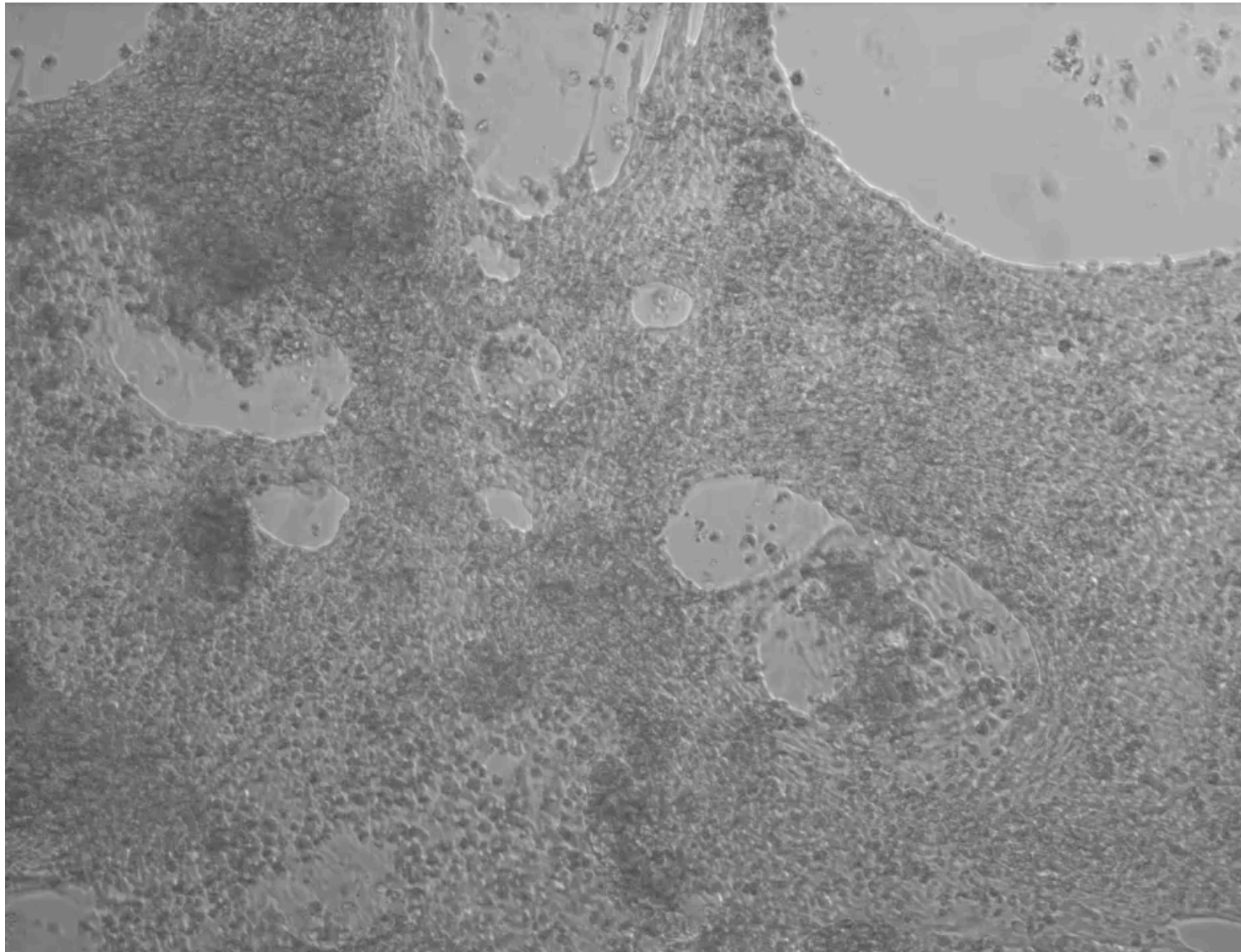




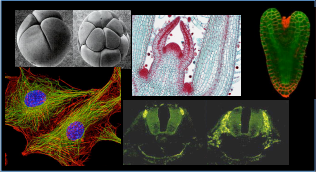
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Une cellule différenciée peut-elle revenir en arrière, i.e. redevenir pluripotente?



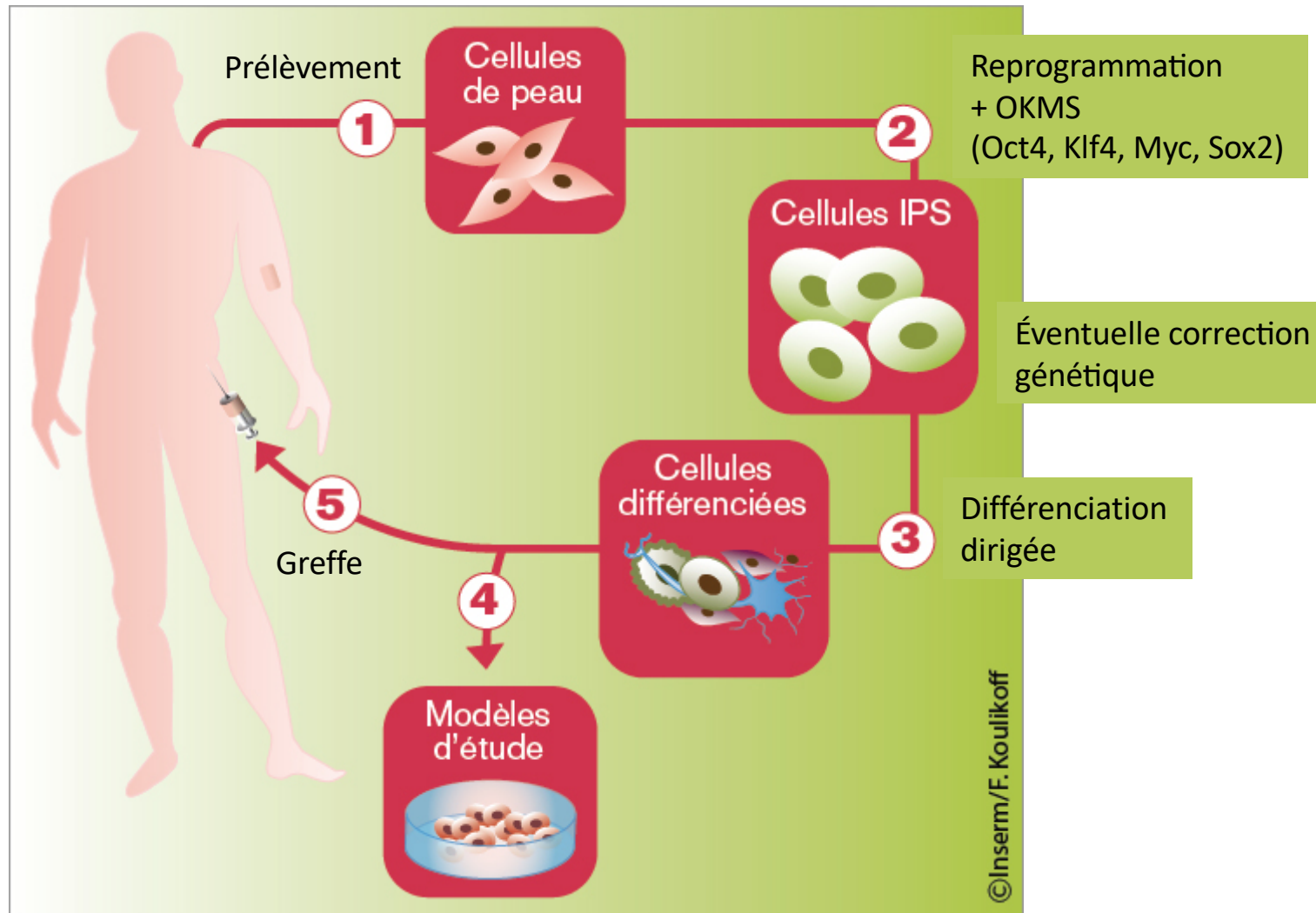
Tissu musculaire
cardiaque obtenu à
partir d'IPS

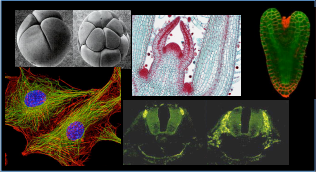


4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Applications thérapeutiques des iPS





4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.1- Restriction des potentialités cellulaires au cours du développement

Interaction Biologie du développement – Biologie des cellules souches

Les données de la biologie du développement permettent la mise au point de protocoles pour:

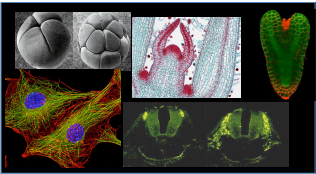
- Diriger la différenciation des ES/iPS vers un type cellulaire d'intérêt
- De nos jours, envisager la formation de nombreux tissus voir organoïdes *in vitro*



Les cellules ES/iPS permettent:

- De comprendre dans un modèle simplifié des processus développementaux difficilement appréhendables *in vivo*
- D'étudier des mécanismes à l'origine de pathologies développementales humaines



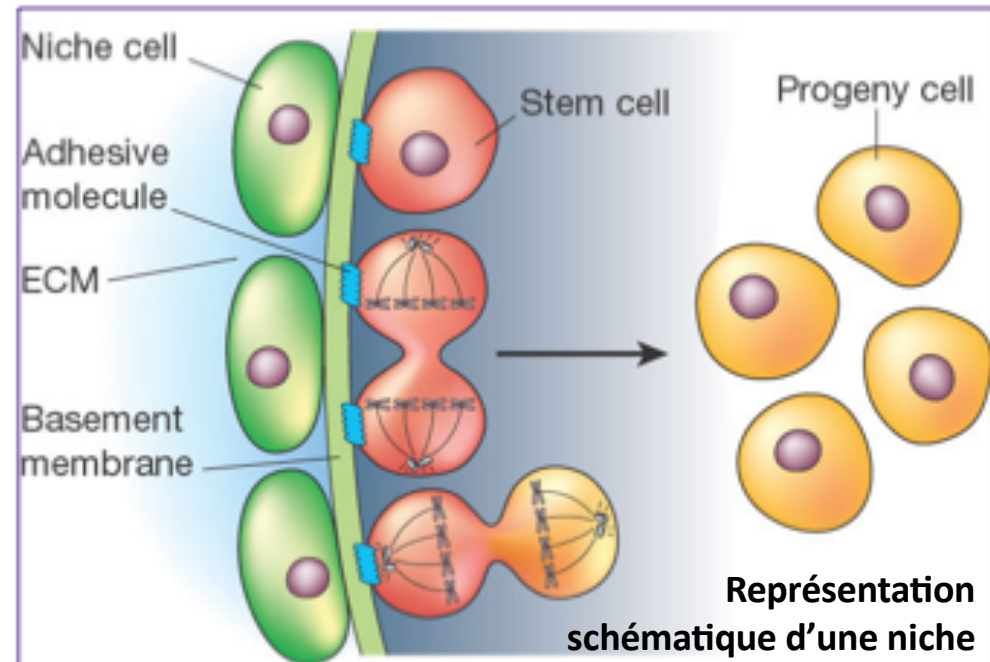
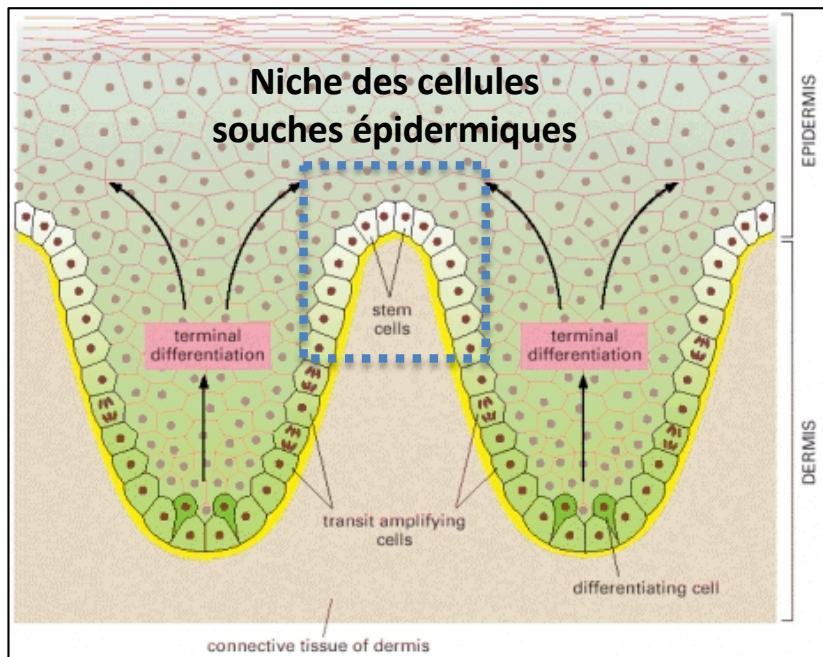


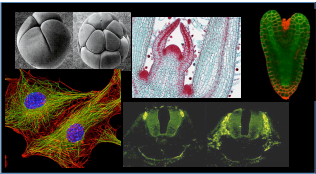
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.2- Les cellules souches adultes

Généralités sur les cellules souches adultes

- ✓ Permettent le **renouvellement cellulaire** (remplacement des cellules mortes et maintien de l'homéostasie tissulaire)
- ✓ Se situent dans des microenvironnements particuliers ou "niches" contrôlant leur auto-renouvellement (via des signaux paracrines et des interactions cellules-matrice)
- ✓ Se divisent peu (cellules quiescentes)
- ✓ Rares et difficilement identifiables dans la plupart des tissus faute de marqueurs spécifiques





4- Cellules souches et différenciation cellulaire

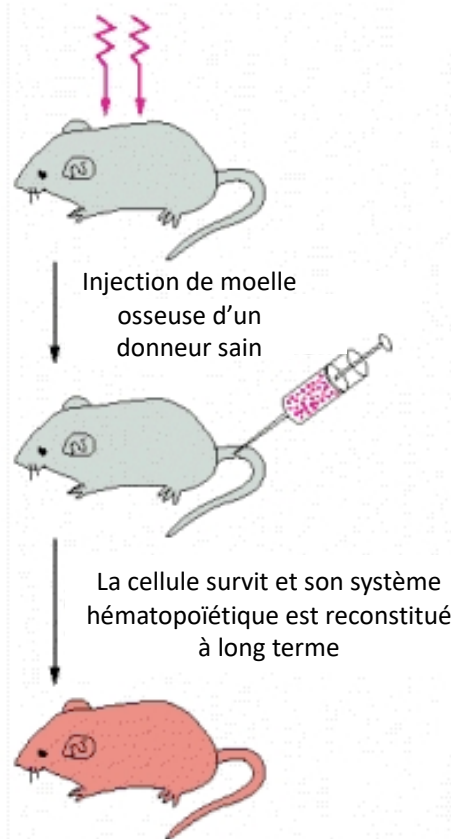
4.2- Les cellules souches adultes

Exemple des cellules souches hématopoïétiques

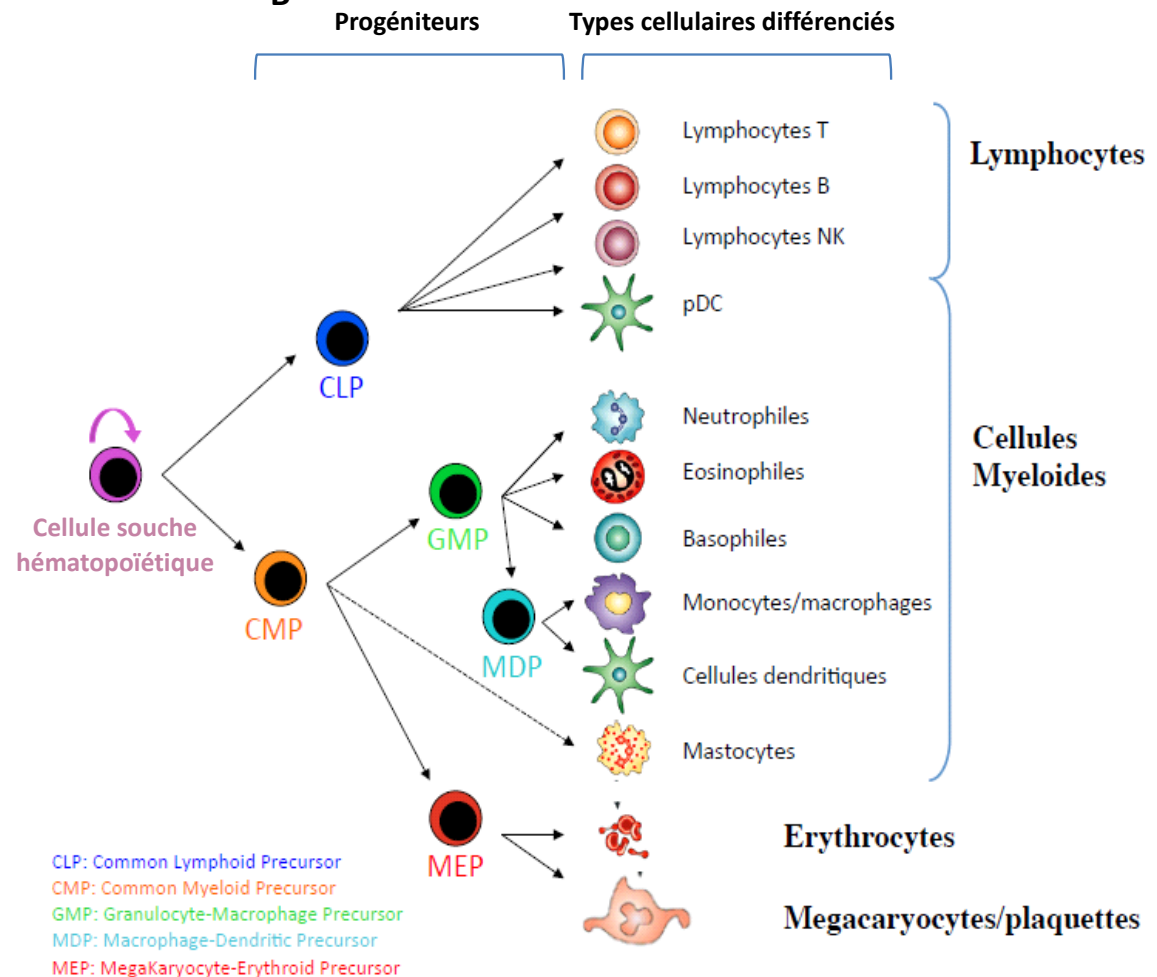
- ✓ Les mieux caractérisées par des marqueurs de surface (isolement possible) et pour leur potentiel de différenciation
- ✓ Propriété fondamentale: capacité de reconstitution complète de l'hématopoïèse à long terme après une irradiation létale

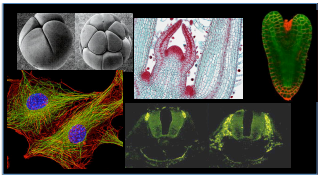
A

Irradiation entraînant la mort de toutes les cellules sanguines (situation létale)



B

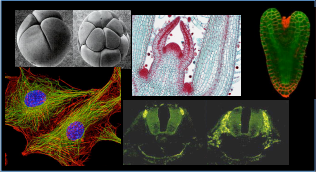




4- Cellules souches et différenciation cellulaire

Résumé parties 4.1 et 4.2

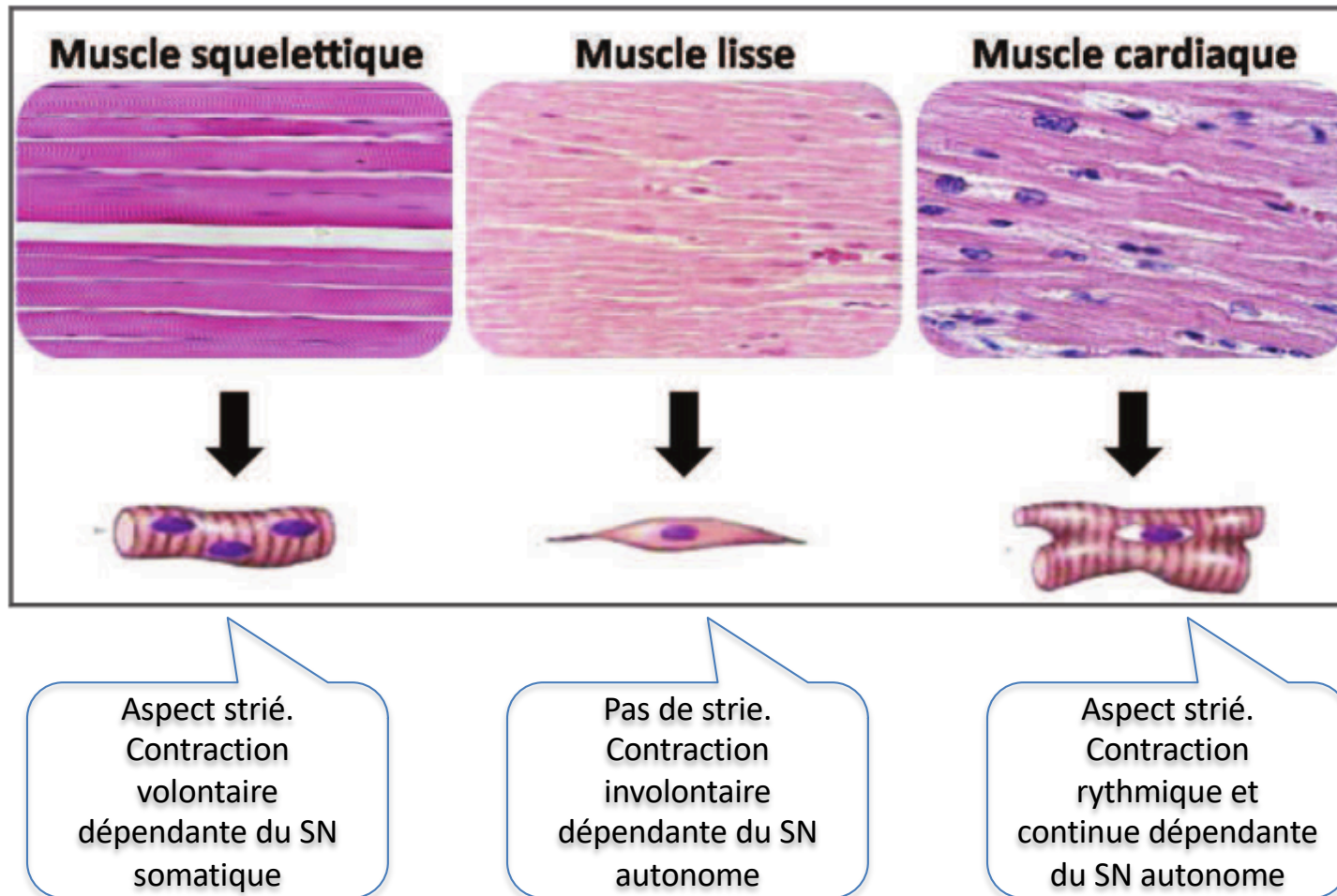
- ✓ Qu'elles soient animales ou végétales, les cellules souches sont des cellules indifférenciées. Elles se distinguent de leurs cellules filles progénitrices, elles-mêmes indifférenciées, par leur propriété d'auto-renouvellement.
- ✓ Les cellules souches embryonnaires pluripotentes animales suscitent de nombreux espoirs pour le traitement par thérapie cellulaire de nombreuses pathologies, notamment des pathologies dégénératives.
- ✓ Chez les animaux, les cellules souches adultes sont essentielles au renouvellement cellulaire et donc à l'homéostasie du tissu (équilibre entre perte et production de nouvelles cellules). Dans certains tissus comme l'intestin, les cellules souches permettent également de compenser des pertes cellulaires plus importantes après une lésion (phénomène de régénération).
- ✓ L'activité des cellules souches adultes chez l'animal (comme celle des cellules souches méristématiques chez les végétaux) est contrôlée par des signaux (signaux diffusibles ou signaux de contact) émanant de leur niche, c'est à dire le microenvironnement dans lequel elles se trouvent.

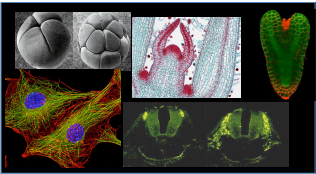


4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.3- Caractéristiques des cellules musculaires striées

Les différents types de muscles

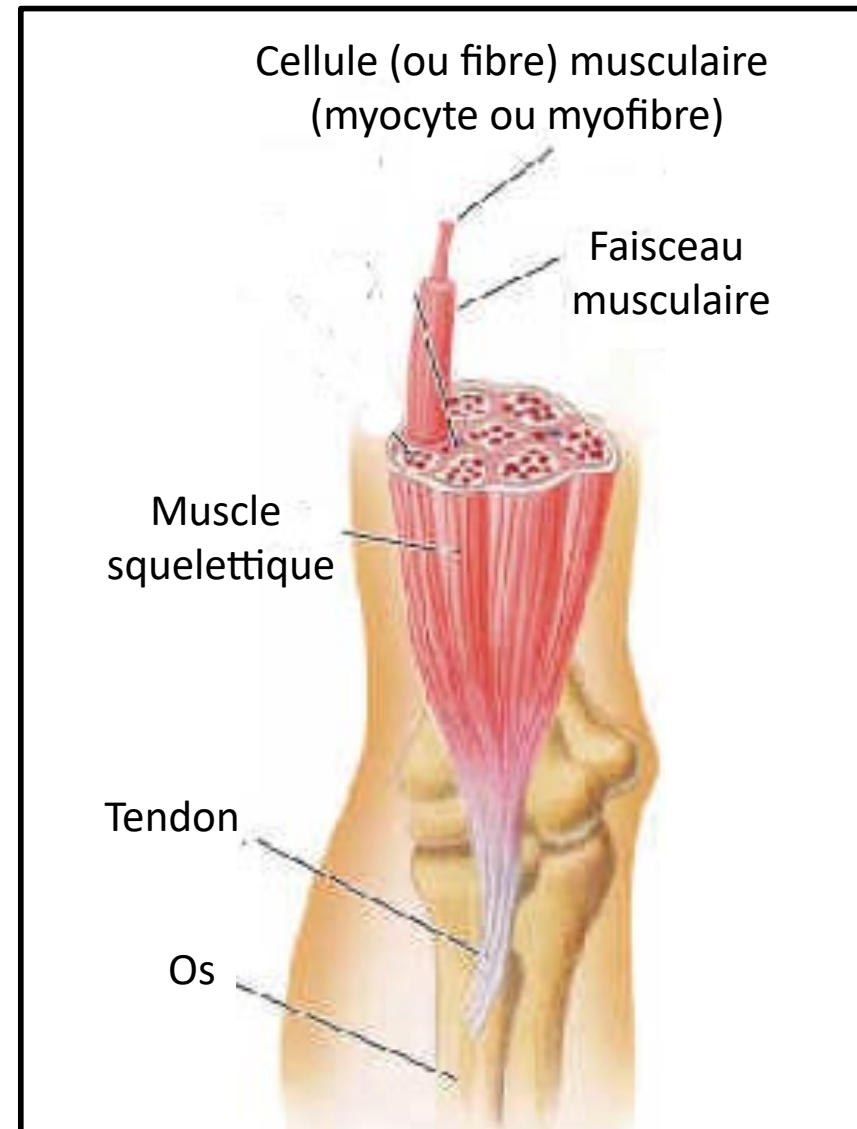
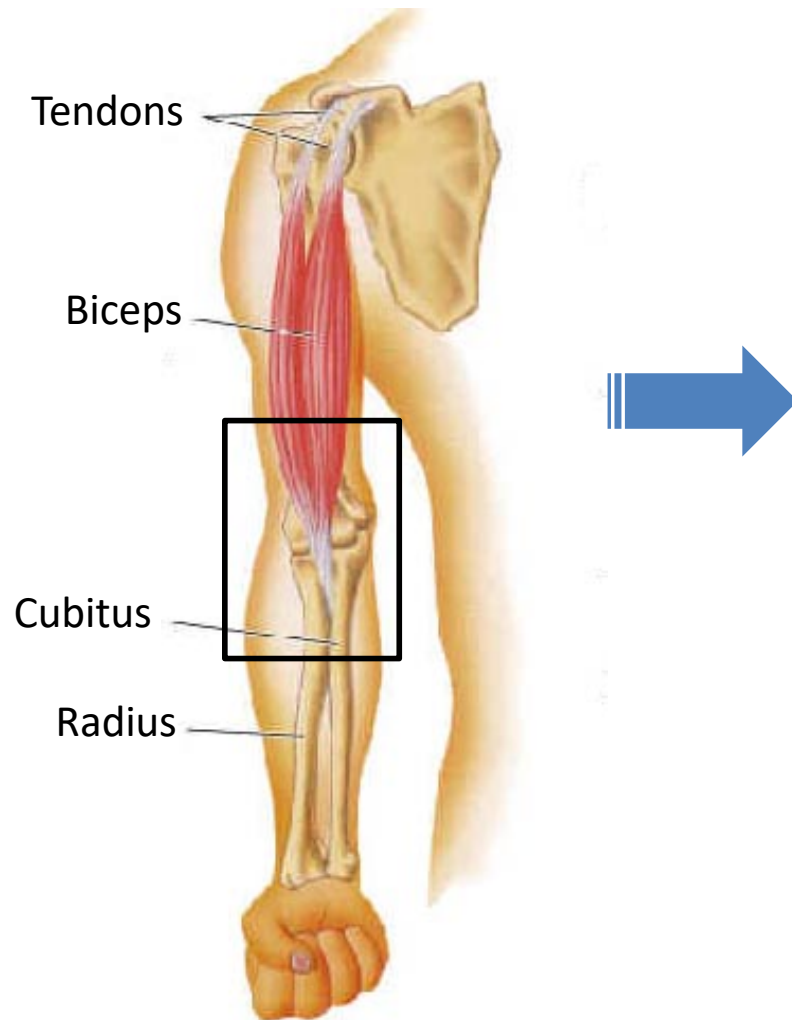


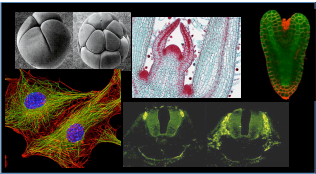


4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.3- Caractéristiques des cellules musculaires striées

Organisation du muscle squelettique

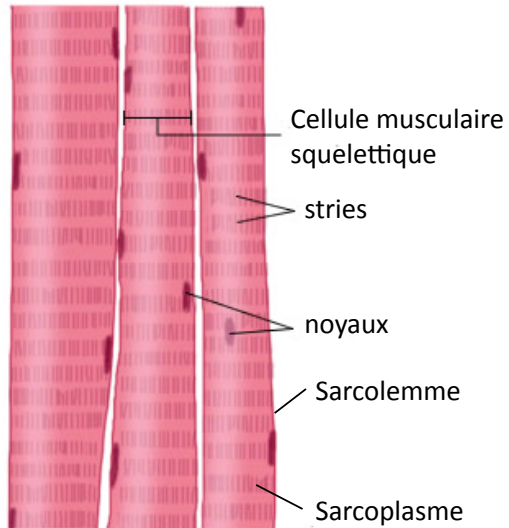




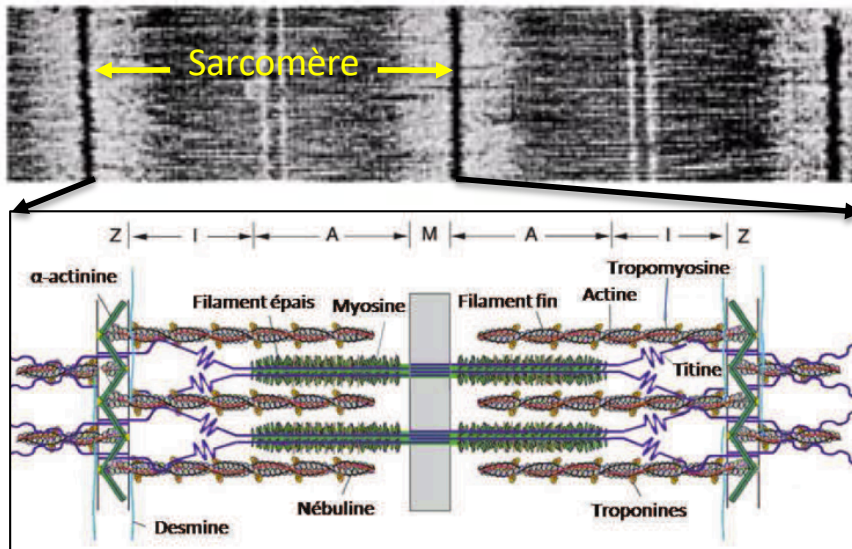
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.3- Caractéristiques des cellules musculaires striées

Les cellules musculaires striées: des cellules hautement spécialisées



Myofibrille observé au microscope électronique

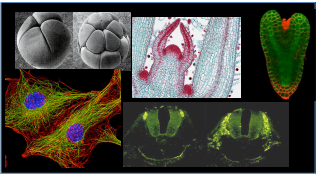


✓ Forme cylindrique (*diamètre*: 30 à 100 μm ;
longueur: celle du muscle)

✓ Cellule polynucléée: noyaux nombreux
situés en périphérie de la cellule (= syncytium)

✓ Sarcolemme = membrane plasmique + lame
basale; Sarcoplasme = cytoplasme

✓ Aspect strié lié à la présence des myofibrilles
au sein du sarcoplasme = appareil
cytosquelettique spécialisé dans la contraction
(filaments d'actine et de myosine)

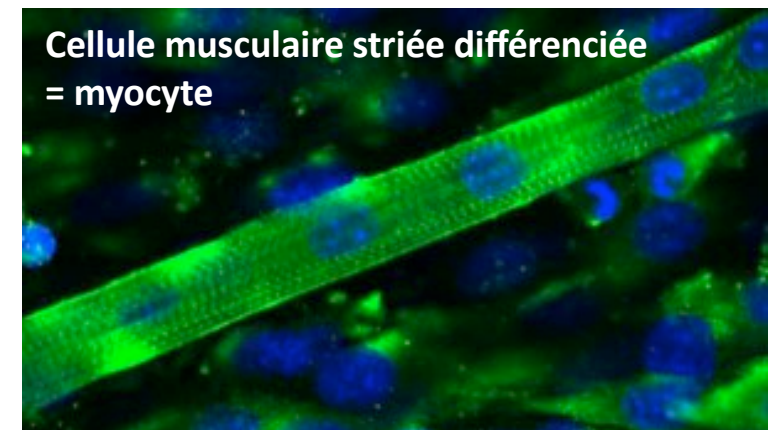
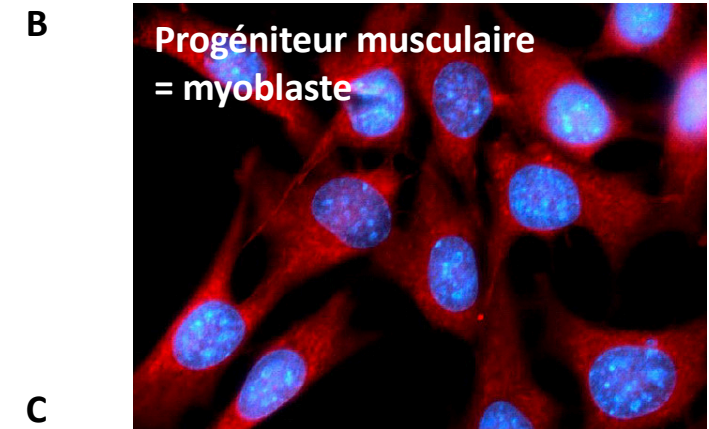
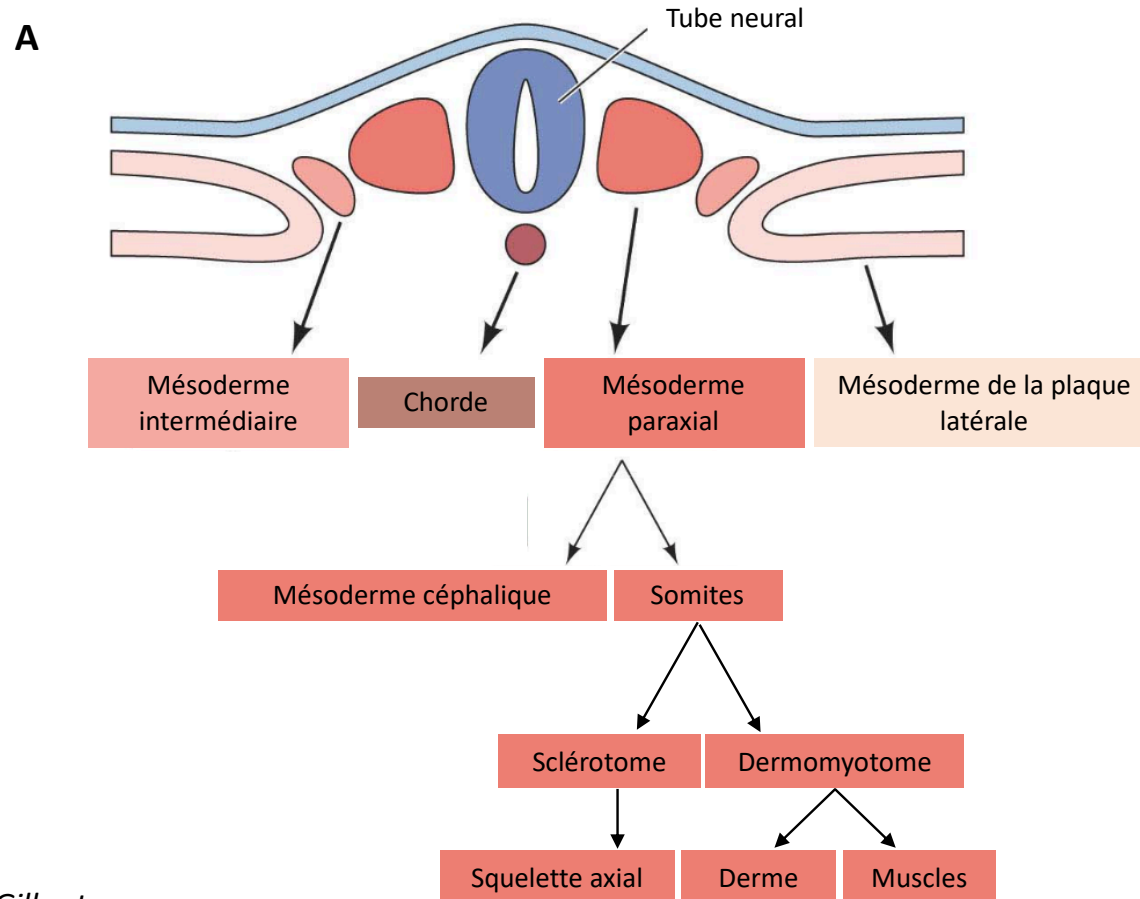


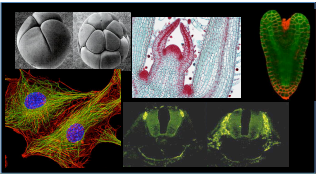
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.3- Caractéristiques des cellules musculaires striées

Origine embryonnaire des cellules musculaires striées

- ✓ Les cellules musculaires striées constituent un des nombreux dérivés du lignage mésodermique paraxial.
- ✓ Leur genèse a nécessité l'induction du mésoderme, la formation au sein de celui-ci du mésoderme paraxial, la formation des somites, leur régionalisation en différents territoires dont le myotome, tissu à l'origine des myoblastes.





4- Cellules souches et différenciation cellulaire

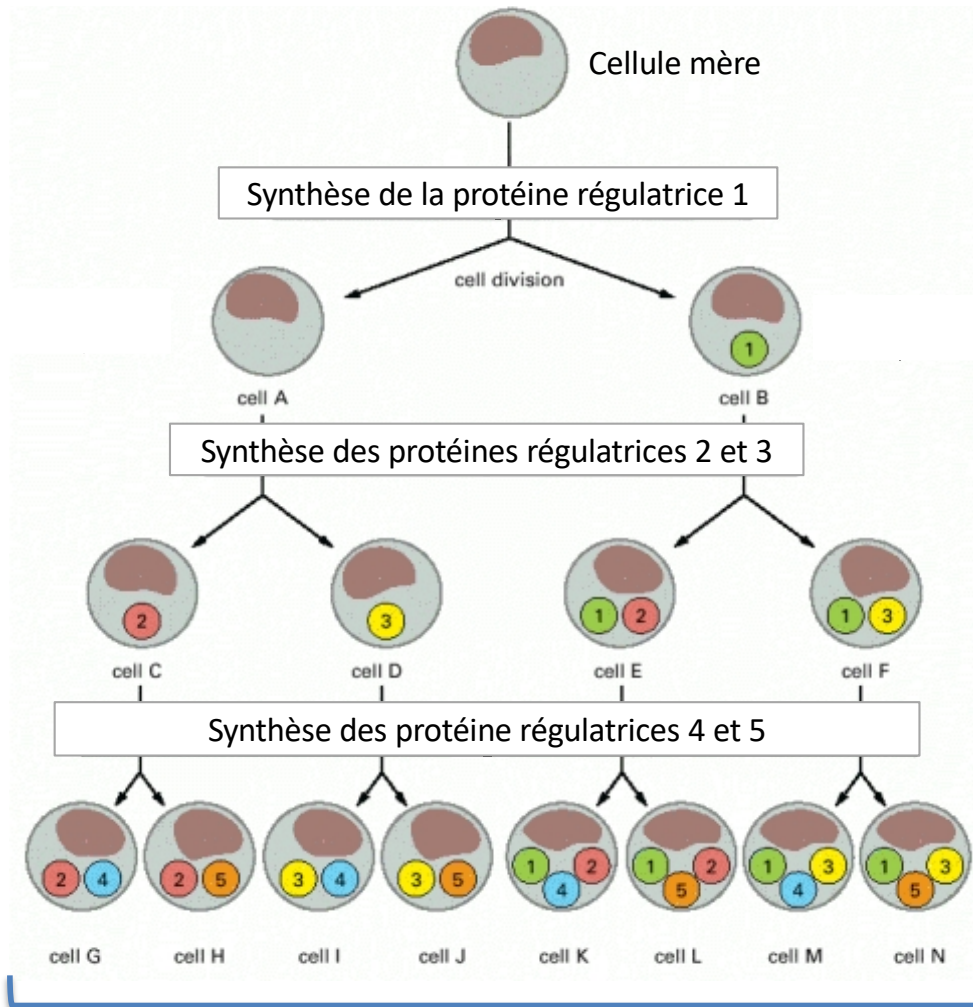
4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules musculaires striées

La différenciation cellulaire est un processus progressif sous contrôle génétique

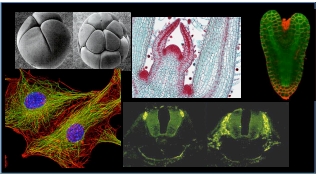
RAPPELS

✓ Les différents types cellulaires différenciés sont les descendants de cellules prolifératives appelées « **progénitrices** ».

✓ Au fil des divisions des progéniteurs (cellules A à N), le destin terminal des cellules filles est progressivement fixé sous l'influence de facteurs intrinsèques ou de signaux extérieurs. On parle de **détermination cellulaire**.



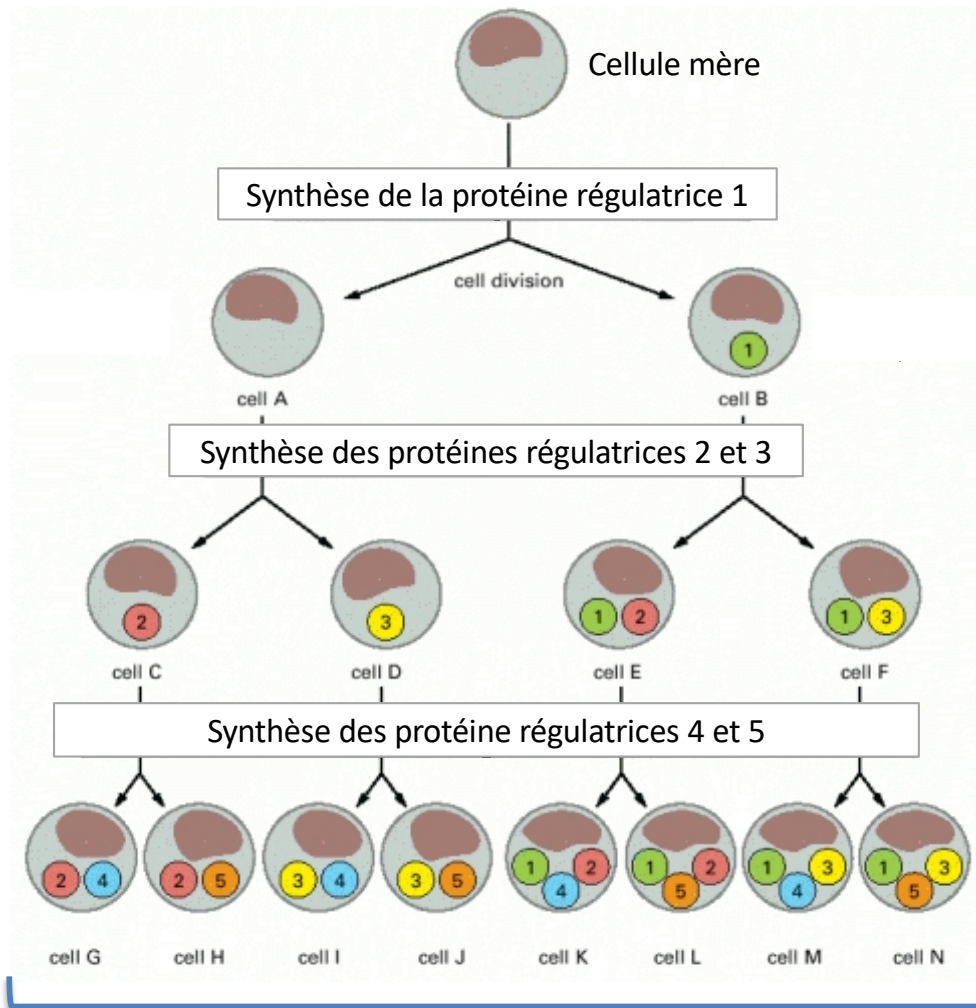
Sortie du cycle et différenciation en types cellulaires G à N



4- Cellules souches et différenciation cellulaire

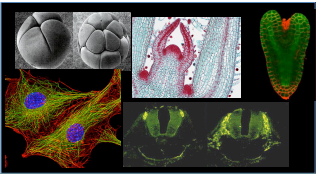
4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

De la cellule de dermomyotome à la cellule musculaire différenciée



Sortie du cycle et différenciation en types cellulaires G à N

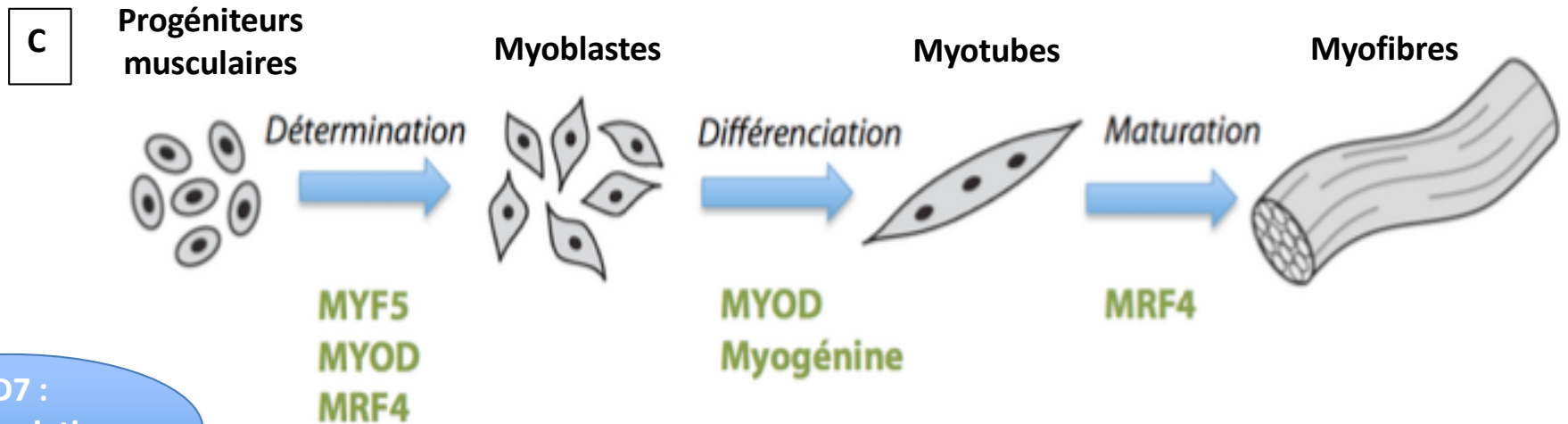
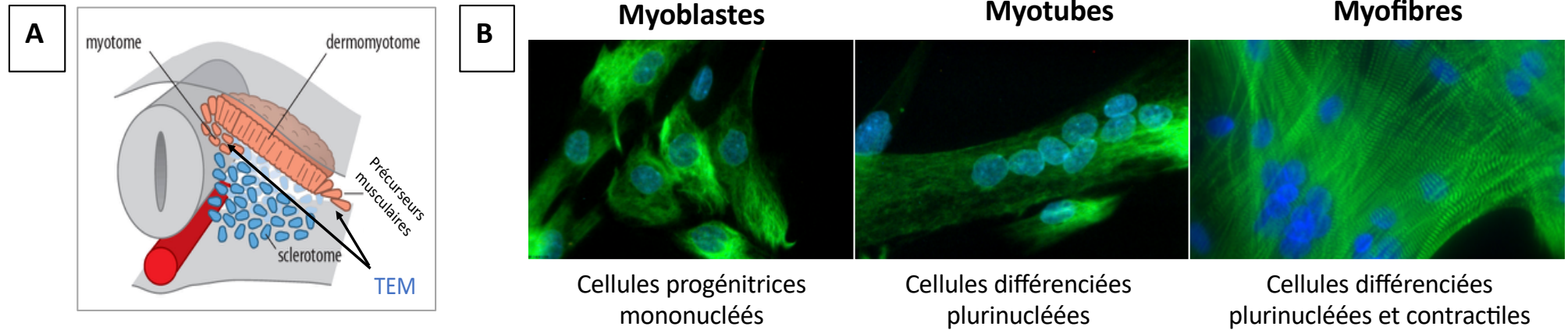
- ✓ La cellule déterminée est engagée dans une voie de différenciation, cependant, il n'y a pas encore de modifications structurales ou fonctionnelles visibles.
- ✓ La cellule différenciée possède une fonction et une morphologie spécialisées et définitives.
- ✓ La transition de l'état déterminé à l'état différencié est progressive et sous contrôle génétique.



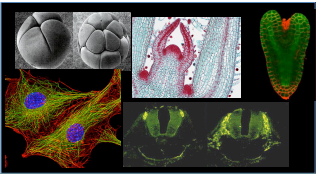
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

De la cellule déterminée de dermomyotome à la cellule musculaire différenciée



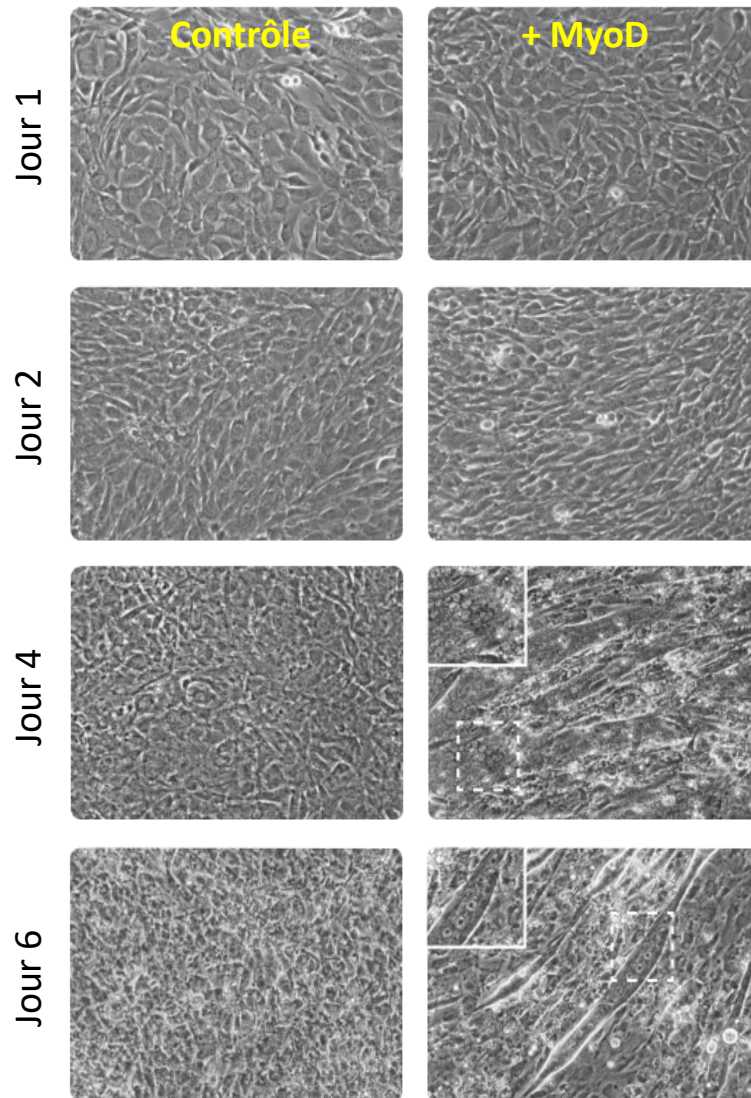
TD7 :
différenciation
myogénique



4- Cellules souches et différenciation cellulaire

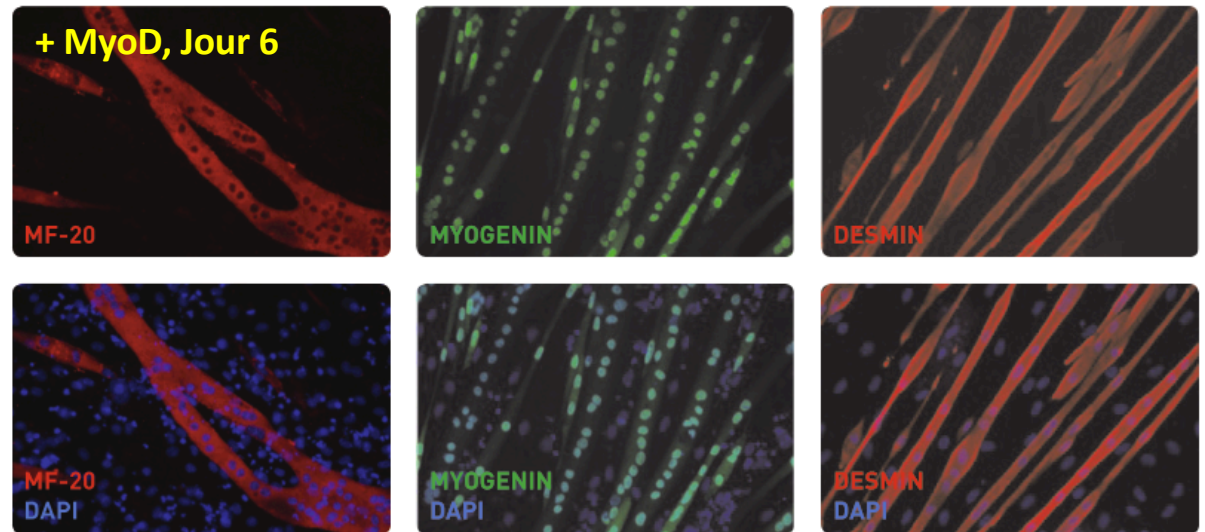
4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

Le facteur de transcription MyoD est suffisant pour convertir des fibroblastes en cellules musculaires

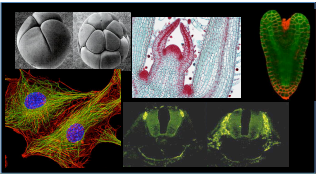


Méthodologie:

Expression forcée de MyoD dans des cellules fibroblastiques C3H10T1/2 en culture



MyoD est SUFFISANT au déclenchement et à la réalisation d'un « programme » de différenciation musculaire *in vitro*.

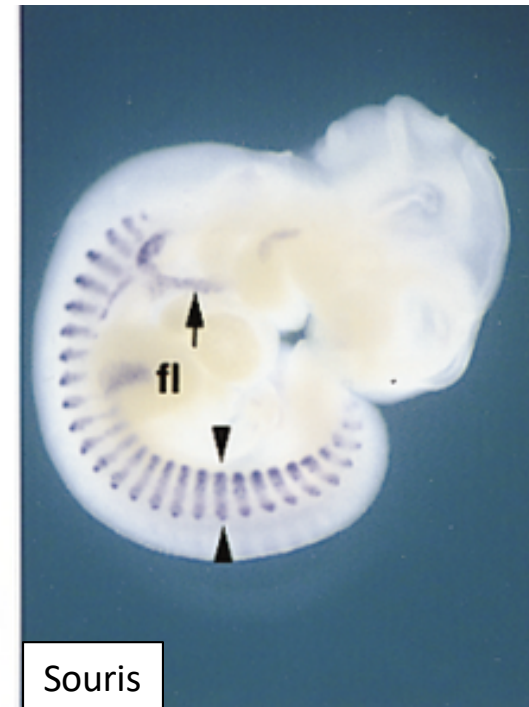
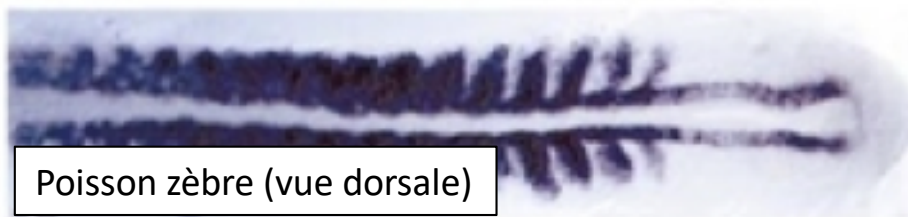
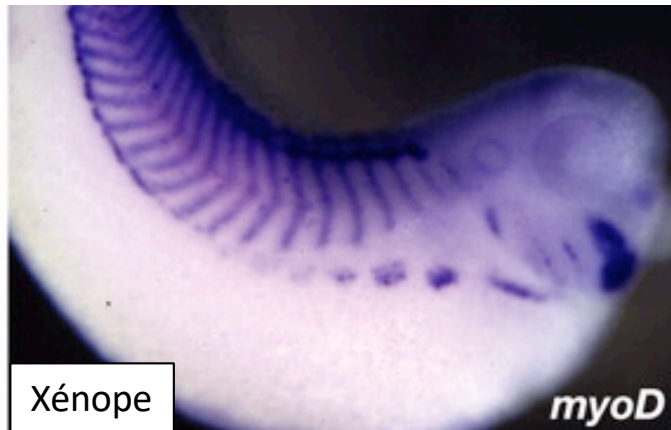


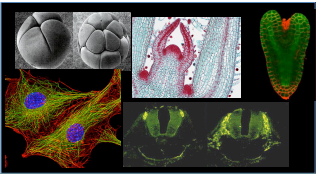
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

MyoD appartient à une famille de facteurs de transcription très conservés: les MRF

- ✓ Protéines MRFs (**M**uscle **R**egulatory **F**actors): facteurs de transcription à domaine bHLH (basic-Helix-Loop-Helix)
- ✓ Séquences et fonctions très conservées chez les Vertébrés. Orthologues retrouvés également chez les invertébrés
- ✓ Incluent MyoD, Myf5, Myogénine (=Myf4) et Mrf4 (=Myf6)

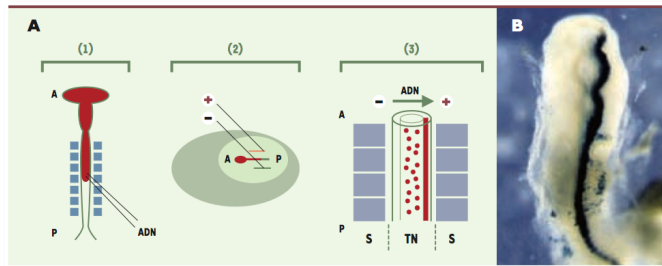




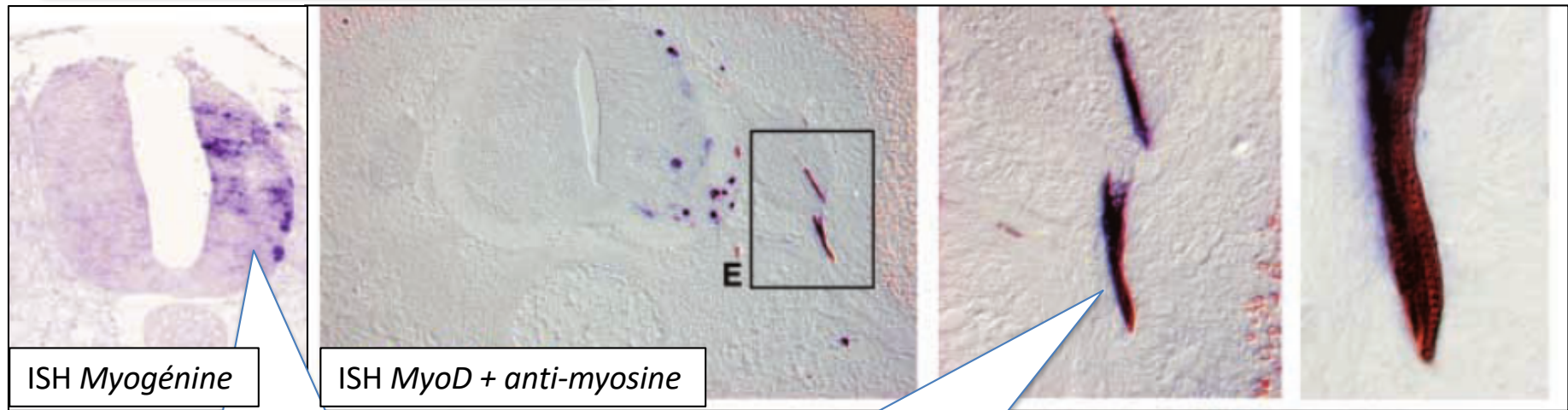
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

Le facteur de transcription MyoD est suffisant pour convertir des progéniteurs neuronaux en cellules musculaires



Méthodologie: Surexpression de MyoD dans le tube neural de l'embryon de poulet (électroporation)



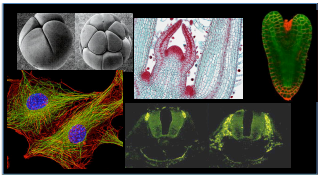
ISH *Myogénine*

ISH *MyoD* + anti-myosine

La surexpression de MyoD induit l'expression du gène *myogénine* dans le tube neural

La surexpression de MyoD induit La formation de myotubes ectopiques

➔ MyoD est SUFFISANT au déclenchement et à la réalisation d'un « programme » de différenciation musculaire *in vivo*.



4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

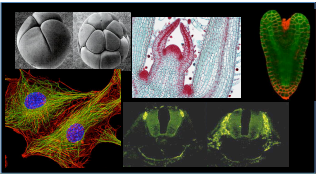
Rôle des facteurs de transcription MRF dans la détermination et la différenciation musculaire

✓ La perte de fonction (KO) des MRFs chez la souris a permis de déterminer à quel stade chacun agissait.

Perte de fonction	Phénotype			
	Viabilité	Formation des myoblastes	Formation des muscles	Rôle
<i>MyoD</i>	OUI	+	+	
<i>Myf5</i>	OUI	+	+	
<i>MyoD;Myf5</i>	NON	-	-	Détermination musculaire
<i>Myogénine</i>	NON	+	-	Différenciation musculaire
<i>MRF4</i>	NON	+	+	Différenciation musculaire

MyoD et Myf5 ont des fonctions partiellement redondantes

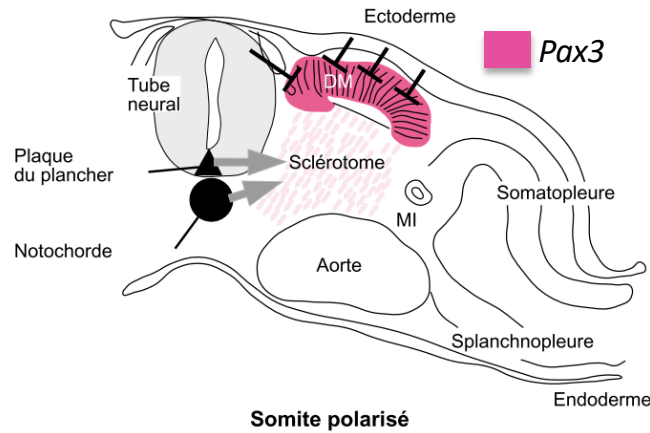
MRF4 n'est pas nécessaire à la différenciation musculaire (fonction partiellement redondante avec autre MRF?)



4- Cellules souches et différenciation cellulaire

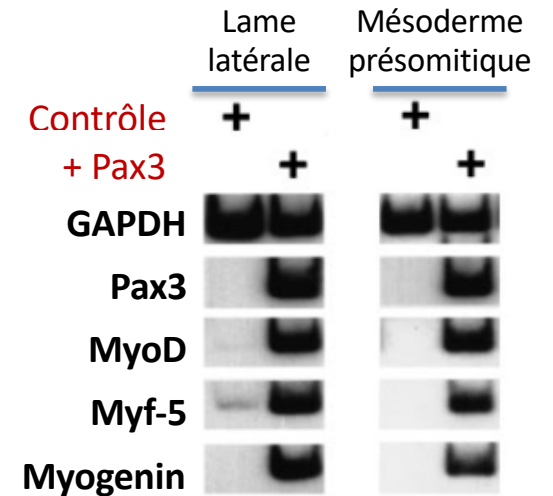
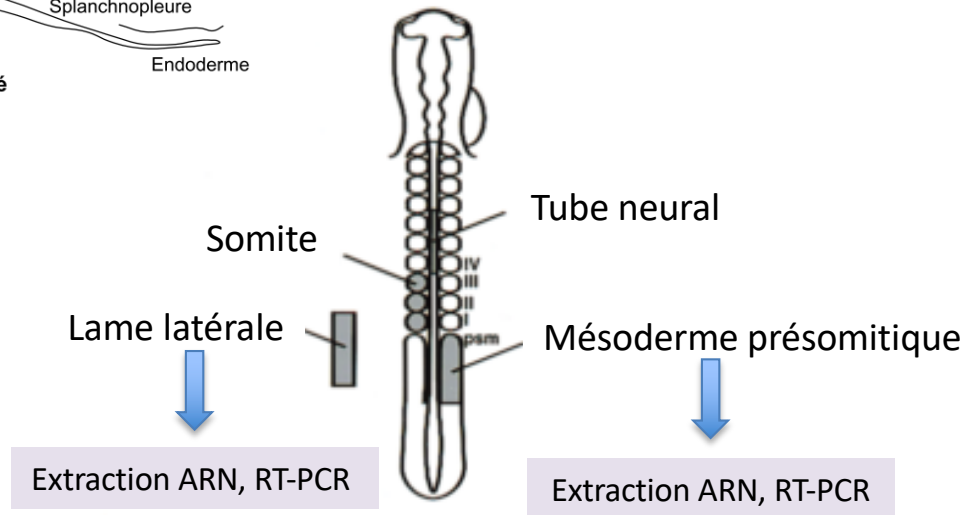
4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

Les facteurs de transcription MRF sont activés en aval de Pax3

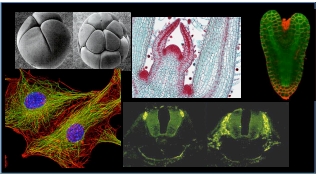


Méthodologie:

Expression forcée de Pax3 dans des explants de mésoderme présomitique ou de mésoderme des lames latérales



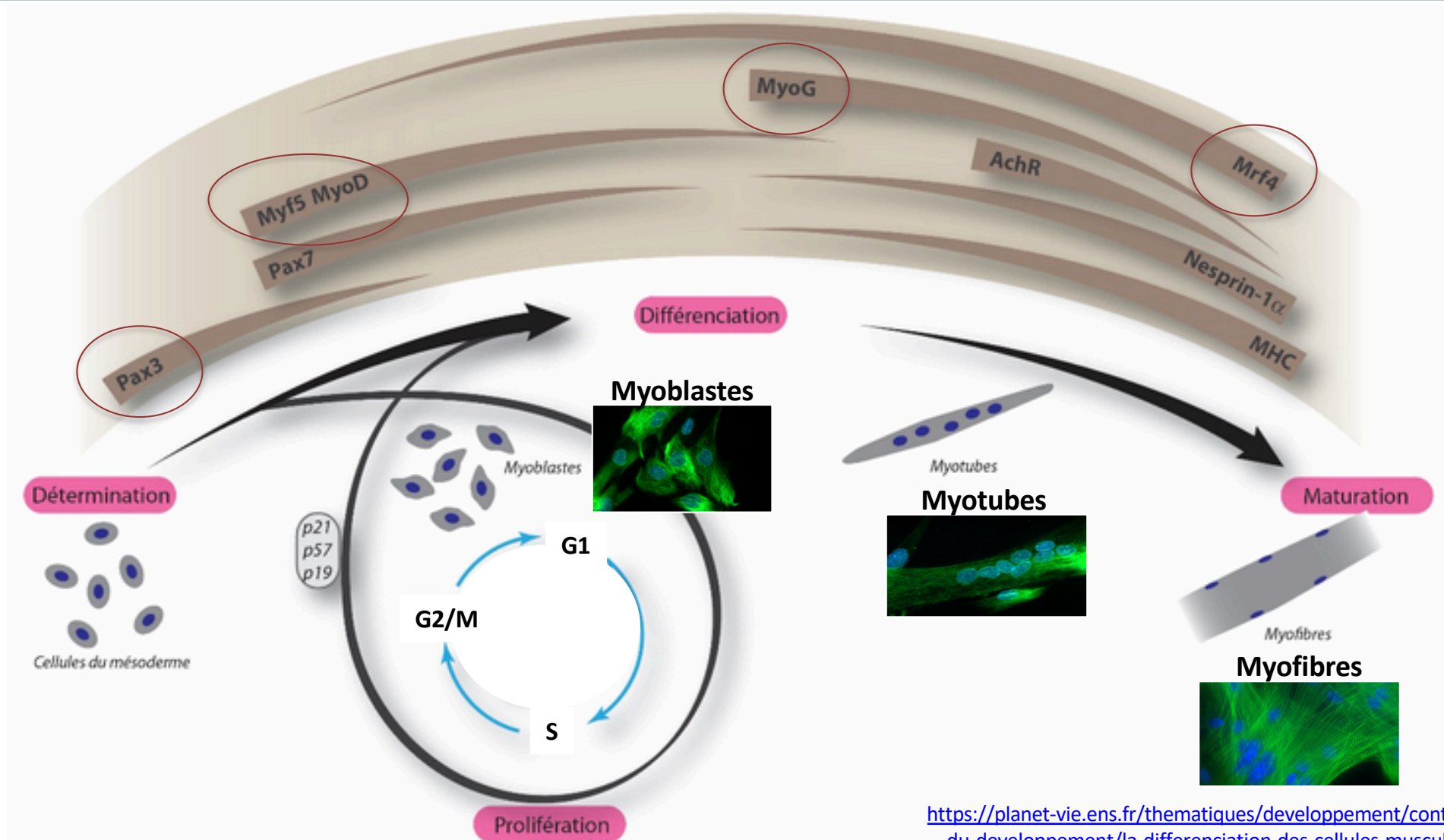
➡ Pax3 est SUFFISANT à l'induction de l'expression des MRFs

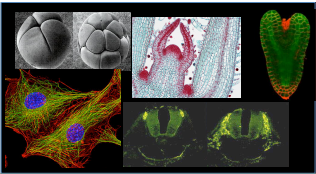


4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules musculaires striées

Bilan : la différenciation repose sur l'expression finement contrôlée dans le temps de facteurs de transcription spécifiques





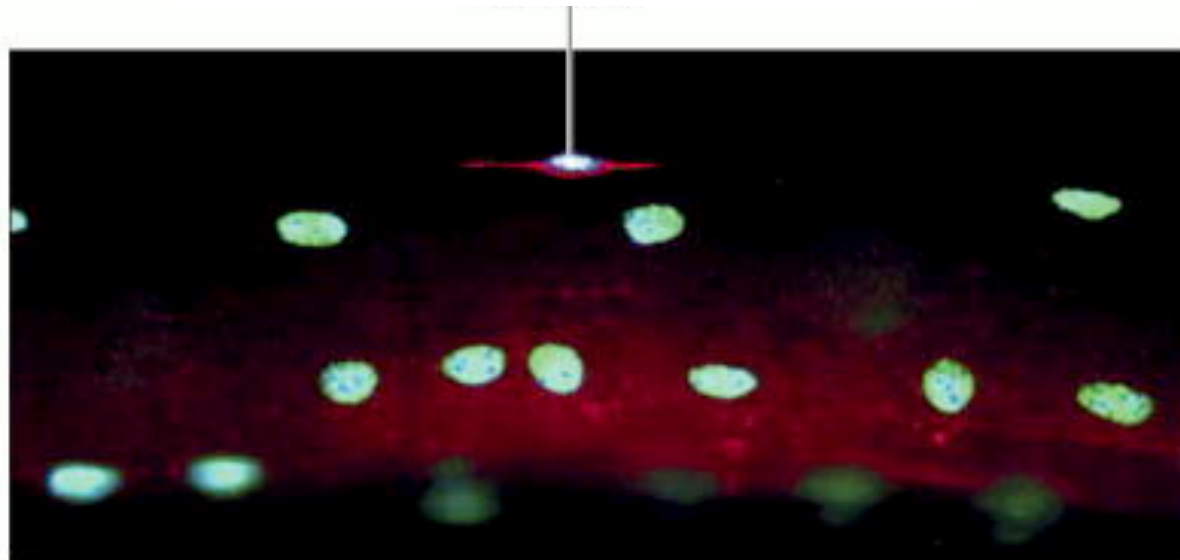
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

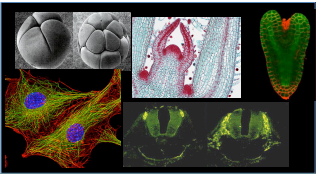
4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

Les cellules satellites, cellules souches musculaires adultes

- ✓ Les cellules satellites musculaires sont des cellules souches situées entre la lame basale et les cellules musculaires striées dans le tissu musculaire

Cellule satellite accolée à une fibre musculaire





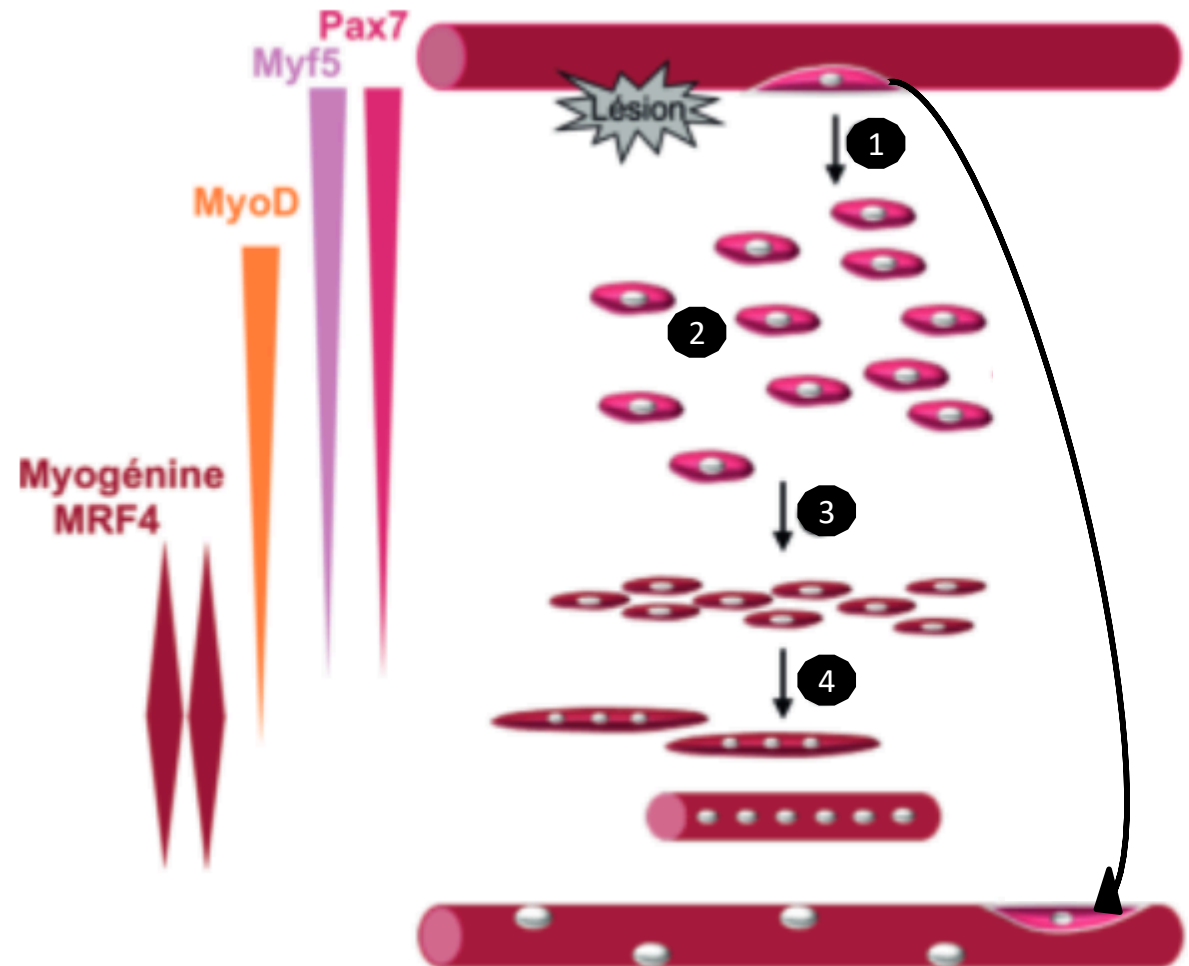
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

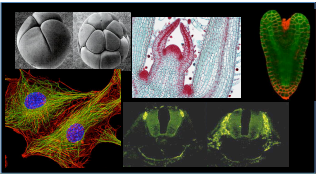
4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

Réactivation des cellules souches après exercice ou en cas de lésion musculaire

✓ Les cellules satellites musculaires, normalement quiescentes, sont **RÉACTIVÉES** par l'exercice (contribution à l'augmentation de la masse musculaire) ou après une lésion

✓ La formation de nouvelles fibres musculaires suit le **même programme génétique** que celui de la myogenèse embryonnaire.





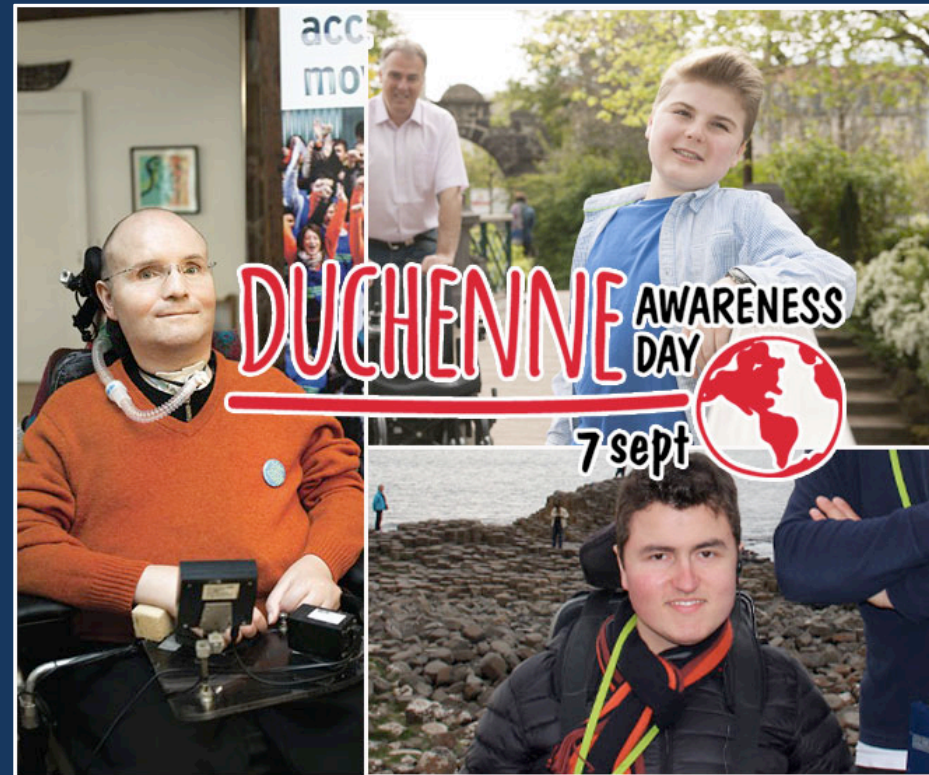
4- Cellules souches et différenciation cellulaire

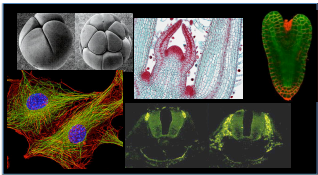
4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

Les enjeux de la médecine régénérative

- ✓ Les cellules souches musculaires sont peu nombreuses et leur capacité d'auto-renouvellement est limité
 - ➔ diminution avec l'âge et épuisement dans certaines pathologies comme la myopathie de Duchenne

- ✓ La dystrophie de Duchenne:
 - Maladie génétique: mutations du gène DMD codant la dystrophine (chromosome X); 1/4000 garçons (rare chez les filles)
 - Symptômes: faiblesse musculaire
 - Évolution de la maladie: Apparition vers 5 ans puis aggravation progressive (quasi-totalité des patients en fauteuil roulant à partir de 12 ans).
Espérance de vie en moyenne de 25 ans en raison des déficits des muscles respiratoires
 - Causes: Dégénérescence des fibres musculaires





4- Cellules souches et différenciation cellulaire

4.4- Analyse des étapes de la détermination et de la différenciation des cellules muscul. striées

Résumé partie 4.4

- ✓ Au cours du développement embryonnaire, des inductions en cascade fixent les destinées des différents types cellulaires.
- ✓ Les cellules musculaires dérivent de structures appelées somites, eux-mêmes dérivés du mésoderme paraxial.
- ✓ L'action de signaux paracrines émanant des tissus environnants permet de régionaliser les somites et de fixer les destins sclérotome et dermomyotome. Au sein de ce dernier, des myoblastes sont déterminés et le processus de différenciation va s'enclencher.
- ✓ La différenciation est un processus progressif qui nécessite l'activation d'un programme génétique (rôle en cascade de facteurs de transcription qui vont modifier l'expression génique dans les cellules et ainsi leur permettre d'acquérir leurs fonctions spécialisées).
- ✓ La différenciation musculaire au cours du développement comme chez l'adulte est sous contrôle des facteurs de transcription de la famille MRF.