

Inductions embryonnaires

Vous avez vu en synthèse 5 les grandes étapes du développement des organismes animaux et végétaux et constaté, à l'échelle macroscopique, les transformations majeures de l'embryogenèse depuis la cellule œuf ou zygote jusqu'au juvénile ou à la plantule. Nous avons vu également en synthèses 3 et 6, qu'à l'échelle cellulaire, ces transformations reposent sur des comportements fondamentaux (division, croissance/élongation cellulaire, différenciation et, chez les animaux spécifiquement, migration).

L'enjeu de la synthèse 7 est de vous montrer comment la communication entre groupes de cellules contribue à modeler l'embryon et à fixer le destin des différents territoires qui le composent, aboutissant à la formation de tissus qui occupent une place spécifique dans le plan d'organisation. Le processus sous-jacent se nomme **induction**. Une induction embryonnaire fait intervenir un groupe de cellules ou un **tissu dit « inducteur »**, à l'origine d'un **signal chimique diffusible** qui va être perçu par un groupe de cellules ou **tissu « cible » compétent**. Chez ce dernier, la réception du signal va entraîner des **modifications d'expression génique** qui vont contribuer à **déterminer sa destinée**. On note que la compétence d'un tissu à répondre à un signal donné dépend notamment de la présence de récepteurs spécifiques à la surface des cellules.

Les processus d'inductions sont très dynamiques et ont lieu tout au long de l'embryogenèse. Un tissu nouvellement induit peut à son tour devenir inducteur des tissus environnants (Figure 1). Nous verrons dans cette synthèse comment des inductions embryonnaires très précoces contribuent à la mise en place du plan d'organisation de l'embryon animal ou végétal puis nous étudierons un exemple d'induction embryonnaire plus tardif, à l'origine de la détermination des différents territoires somitiques.

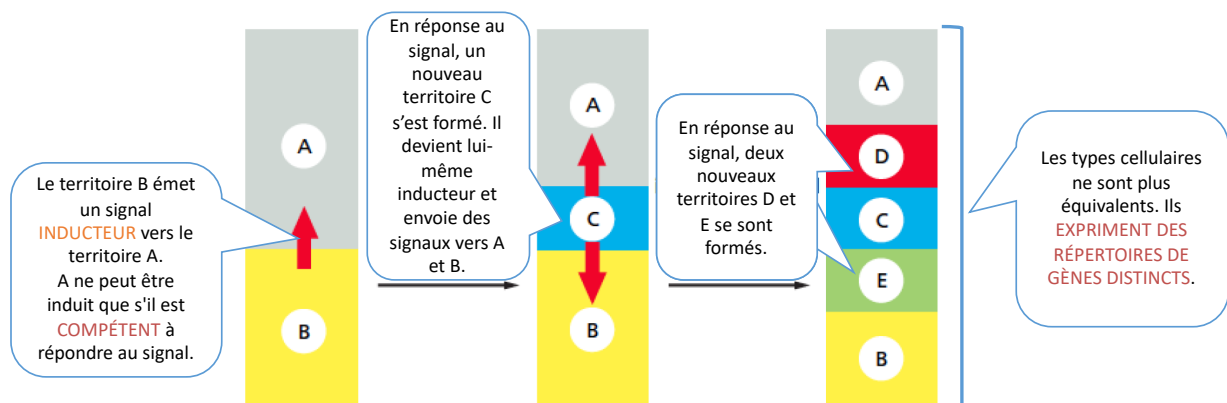


Figure 1 : Représentation schématique d'une cascade de signaux inducteurs aboutissant à la détermination de différents territoires embryonnaires.

Inductions embryonnaires précoces dans l’embryon de Xénope.

Mise en évidence de l’induction du mésoderme au cours de la segmentation

La Figure 2 présente la **carte des territoires présomptifs** au stade blastula, dressée à la suite d’expériences de lignage chez le Xénope (cf **synthèse 5**). Cette carte simplifiée **renseigne sur le devenir des cellules en fonction des zones dans l’embryon**. Cependant, elle n’indique pas comment les différents territoires ont été mis en place, ni si, au stade où la carte est dressée, tous les territoires sont déjà déterminés (i.e. si leur destinée est déjà fixée).

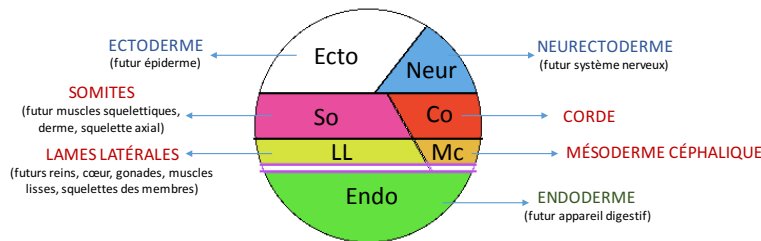


Figure 2 : Carte des territoires présomptifs en fin de segmentation (stade blastula). À ce stade, tous ces territoires ne sont pas encore déterminés. Leur détermination nécessite l’action d’inducteurs. À ce stade le

mésoderme a déjà été induit dans la zone marginale mais il n’est pas encore régionalisé en somites, corde, lames latérales et mésoderme céphalique. Le neuroectoderme n’a pas encore été induit. Le destin de ces territoires sera fixé plus tardivement, en cours de gastrulation.

Comment le mésoderme a-t-il été induit ? Observez la Figure 3 qui décrit des expériences de associations d’explants de calottes animales (CA) et végétatives (CV).

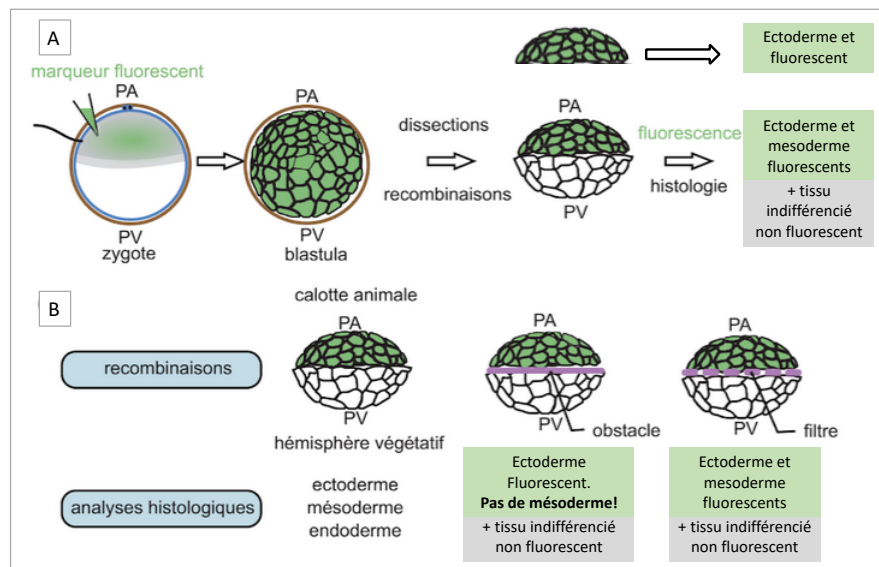


Figure 3 : Expériences d’associations de calottes animales (CA) et végétatives (CV). **(A)** Des CA sont prélevées sur des blastulas fluorescentes puis associées à des CV d’embryons non fluorescents au même stade. Trois jours après, une analyse histologique est effectuée pour déterminer la nature des tissus fluorescents. **(B)** Même expérience mais cette fois une barrière

impermeable ou un filtre poreux est inséré entre la CA et la CV. PA : pôle animal ; PV pôle végétatif.

(A) Nous remarquons qu’une CA cultivée seule (témoin négatif) se différencie en ectoderme. En revanche, une CA mise au contact d’une CV génère des dérivés mésodermiques en plus de l’ectoderme. **Conclusion : le mésoderme est donc induit par les cellules de la CV.**

(B) Cette induction n’a pas lieu si une barrière imperméable sépare la CA et la CV, suggérant soit la nécessité d’un contact CA/CV, soit la diffusion d’un signal de la CV vers la CA. L’ajout d’un filtre évitant le contact direct entre les cellules des deux calottes mais perméable aux molécules diffusibles permet de **conclure que l’induction repose sur l’émission d’un signal diffusible.**

À quel stade le destin mésodermique commence-t-il à être déterminé ? Observez maintenant la Figure 4 qui décrit des expériences de culture *in vitro* de calottes animales et végétatives disséquées à partir d'embryons au stade 32 ou 128 cellules.

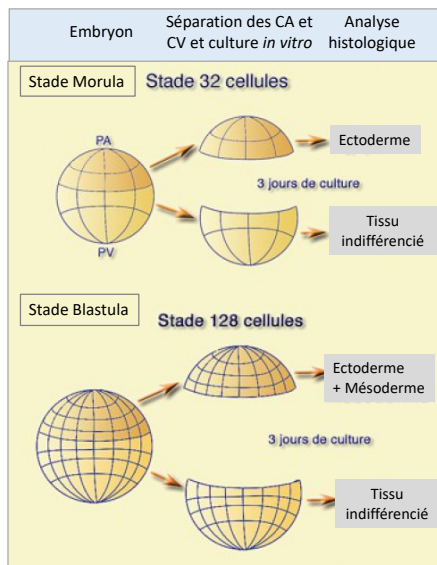


Figure 4 : Expériences de dissociation de calottes animales (CA) et végétatives (CV). Les calottes sont prélevées au stade 32 ou 128 cellules puis cultivées séparément. On effectue ensuite une analyse histologique pour identifier la nature des tissus qu'elles engendrent. PA : pôle animal ; PV pôle végétatif.

Au stade 32 cellules, l'analyse révèle que la CA se différencie en ectoderme. Elle était donc déjà déterminée vers un destin ectodermique mais pas encore déterminée à générer du mésoderme. En revanche, au stade 128 cellules, elle génère de l'ectoderme et du mésoderme. L'induction mésodermique a donc débuté entre le stade 32 et 128 cellules. On note qu'à ces stades la CV n'est pas encore déterminée à devenir de l'endoderme.

Quelle est la nature des inducteurs mésodermiques ? Historiquement, les molécules impliquées dans l'induction mésodermique ont d'abord été recherchées *in vitro* en testant leur capacité à induire du mésoderme sur des calottes animales. Deux types de protéines ont ainsi été identifiées : le facteur de croissance FGF (Fibroblast Growth Factor) et des membres de la famille TGFβ (Transforming Growth Factor β), incluant la protéine Vg1 et des protéines appelés Xnr (*Xenopus nodal related*) sur lesquelles nous travaillerons en TD. Voyons l'action de Vg1 sur des calottes animales dissociées (Figure 5).

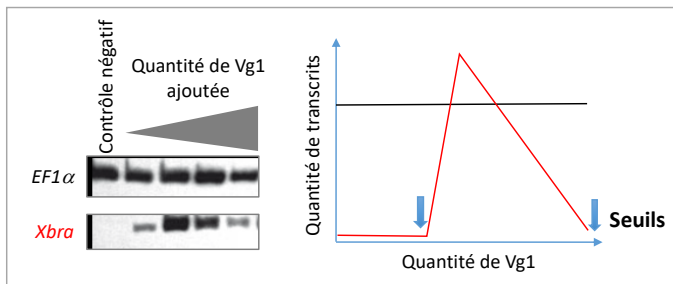


Figure 5 : Analyse par RT-PCR de l'expression du gène *Xbra* (marqueur mésodermique) dans des calottes animales exposées à des doses croissantes de la protéine Vg1. Le gène *EF1α* code une protéine ubiquitaire et sert de contrôle. Le schéma rend compte des résultats. On remarque que l'expression du gène *EF1α*

ne dépend pas de la concentration de Vg1. En revanche, Vg1 active l'expression de *Xbra* avec une efficacité dépendante de sa concentration et de façon non linéaire. D'après Kessler D.S. and Melton D.A. 1995 *Development* 121, 2155-2164.

Cette **action dose-dépendante** de l'inducteur mésodermique Vg1 est caractéristique d'une action « **morphogène** ». Un morphogène est une molécule qui spécifie différents types cellulaires ou différentes régions d'un organisme selon sa concentration. Autrement dit, l'effet observé du morphogène sera différent à faible, moyenne ou forte concentration. Cette dernière peut varier en fonction de la distance à la source via l'établissement d'un gradient de concentration liée à la diffusion de la molécule. Les morphogènes fournissent ainsi une **information de position** aux cellules qui est cruciale pour organiser les destinées cellulaires dans l'espace au cours du développement embryonnaire (Figure 6).

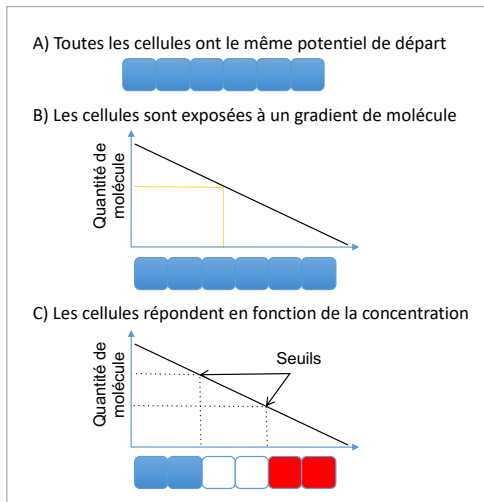


Figure 6 : Représentation schématique de l'action d'un morphogène. Différents types cellulaires (distingués par un code couleur) sont induits en fonction de la concentration du morphogène. Cette dernière peut varier en fonction de la distance à la source (gradient de concentration liée à la diffusion de la molécule).

Mise en évidence d'un centre inducteur des axes embryonnaires (centre organisateur) dans l'embryon précoce.

Nous avons désormais quelques clefs quant aux mécanismes qui permettent d'induire différents tissus dans l'embryon. Mais le développement ne consiste pas uniquement à fixer des destinées. Il faut aussi que les tissus induits soient instruits de leur future position dans l'embryon afin qu'émerge le plan d'organisation de l'espèce. C'est au cours de la gastrulation que le réarrangement spatial des différents tissus va « physiquement » s'opérer, faisant apparaître les axes de polarité de l'embryon de vertébré (antéro-postérieur et dorso-ventral). Mais bien plus tôt, dès le début du développement embryonnaire, des signaux inducteurs émanant d'un « centre organisateur » ont commencé à déterminer les destins cellulaires selon ces axes. La figure 7 vous présente une expérience historique à l'origine de cette notion de centre organisateur.

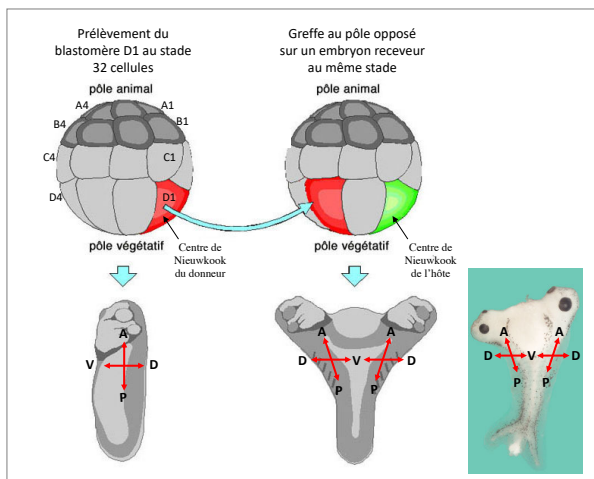


Figure 7 : Le blastomère D1 d'un embryon au stade 32 cellules est greffé au pôle opposé sur un embryon receveur au même stade. L'embryon résultant est siamois, ses axes sont dédoublés. Le blastomère D1 est donc suffisant à l'induction d'un embryon surnuméraire parfaitement organisé selon les axes de polarité. On qualifie D1 de « centre organisateur ». NB : Cette activité n'est retrouvée que dans les blastomères végétatifs diamétralement opposés au point d'entrée du spermatozoïde. Les blastomères végétatifs du côté du point d'entrée du spermatozoïde (exemple ici de D4) ne présentent pas une telle activité.

Le centre organisateur identifié ici au niveau du blastomère D1 est qualifié de « **centre de Nieuwkoop** » du nom du chercheur qui l'a mis en évidence.

Les activités biochimiques contenues dans le centre de Nieuwkoop vont être transmises aux cellules filles du blastomère D1 au cours de la segmentation et vont permettre la synthèse de morphogènes spécifiques qui vont contribuer à organiser le destin des cellules filles dans l'espace, avant même que la gastrulation ne débute.

Comment ces activités inductrices se sont-elles mises en place ?

Les expériences précédentes montrent qu'en fin de segmentation, les cellules ne sont pas équivalentes entre elles, notamment en termes de signaux qu'elles émettent (Figure 8).

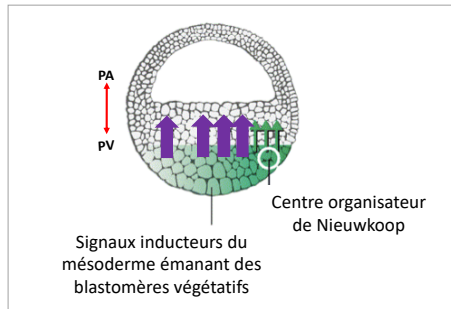


Figure 8 : Représentation schématique et simplifiée des signaux à l'œuvre en fin de segmentation. On distingue notamment des signaux en provenance des blastomères végétatifs (violets) et des signaux émanant du centre organisateur de Nieuwkoop (verts).

Essayons de comprendre comment une telle hétérogénéité s'est mise en place. Il faut pour cela remonter le temps et étudier l'ovocyte. Vous avez vu en synthèse 5 que cette cellule est polarisée. Certaines protéines et certains **ARNm maternels sont localisés dans des zones précises** de l'ovocyte (distribution asymétrique). On les appelle des déterminants ; Ils sont ou codent diverses protéines, parmi lesquelles des facteurs de transcription ou des facteurs paracrines. Tel est le cas des ARNm codant Vg1 qui sont localisés progressivement au pôle végétatif de la cellule au cours de l'ovogenèse (Figure 9). Au cours des premières divisions, les **déterminants cytoplasmiques se répartissent asymétriquement dans les cellules filles**. Celles-ci se distinguent donc les unes des autres d'un point de vue moléculaire. Avec des contenus biochimiques distincts, les blastomères auront notamment des capacités différentes à activer l'expression de gènes spécifiques ou à envoyer des signaux spécifiques aux cellules environnantes.

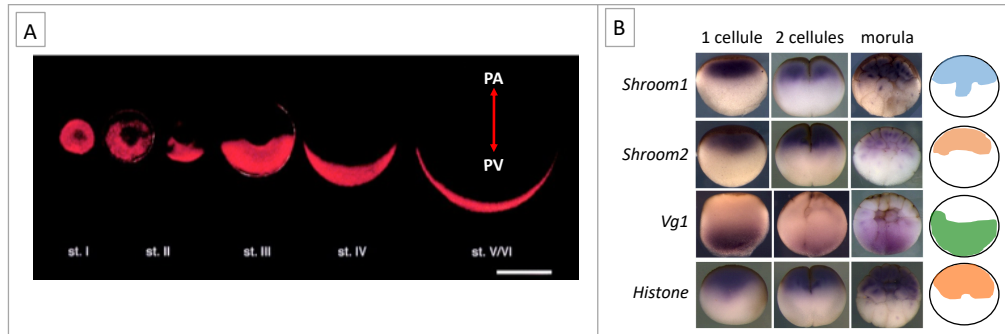


Figure 9 : (A) Hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde fluorescente, montrant la localisation des ARNm Vg1 à différents stades de l'ovogenèse (stades I à VI). En fin d'ovogenèse, ils sont localisés au pôle végétatif. Ce processus est dépendant du transport microtubulaire. D'après Zhang Q. et al. *Mech Dev.* 1999; 88 (1): 101-6. (B) Hybridation *in situ* à l'aide de sondes dirigées contre divers ARNm maternels montrant leur localisation dans différentes régions de l'ovocyte (stade 1 cellule), puis leur héritage différentiel par les cellules filles au cours de la segmentation (stades 2 cellules et morula). D'après Lee C. et al *Dev Dyn.* 2009; 238 (6): 1480-91.

Par ailleurs, vous avez vu en synthèse 5 que la fécondation s'accompagne d'un mouvement du cytoplasme cortical visualisable par l'apparition du croissant gris. Cette **rotation corticale** déplace notamment une protéine du nom de **Dishevelled (Dsh)**, un **activateur de la voie Wnt** (vous avez travaillé sur cette voie en TD). Au cours des divisions de la segmentation, les cellules filles qui héritent de Dsh activent des gènes cibles de la voie Wnt, mais pas les autres.

Ce processus ajoute à l'hétérogénéité précédemment décrite et contribue à la formation du centre de Nieuwkoop (Figure 11).

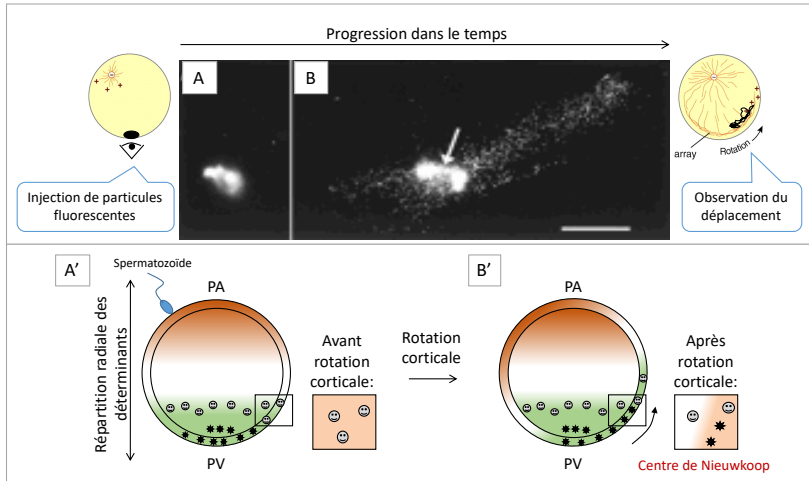


Figure 10 : (A, B) Visualisation du mouvement de particules fluorescentes injectées au niveau du cortex végétatif au cours de la rotation corticale. La fécondation entraîne un remaniement important du réseau microtubulaire (en orange sur les schémas). Il se forme notamment, au pôle végétatif, un faisceau de microtubules alignés de façon parallèle et orientés dans la même direction (array). Ce

faisceau est nécessaire au déplacement du cytoplasme cortical (flèche noire) et à la relocalisation conséquente de composants cytoplasmiques. D'après *Rowling B.A. et al. PNAS 1997 18;94(4): 1224-9.* (A', B') Représentation schématique de l'asymétrie cellulaire avant (A') et après (B') la rotation corticale. Observez la région encadrée : elle ne contient pas les mêmes déterminants avant et après. Le centre de Nieuwkoop vient de se former au pôle opposé au point d'entrée du spermatozoïde.

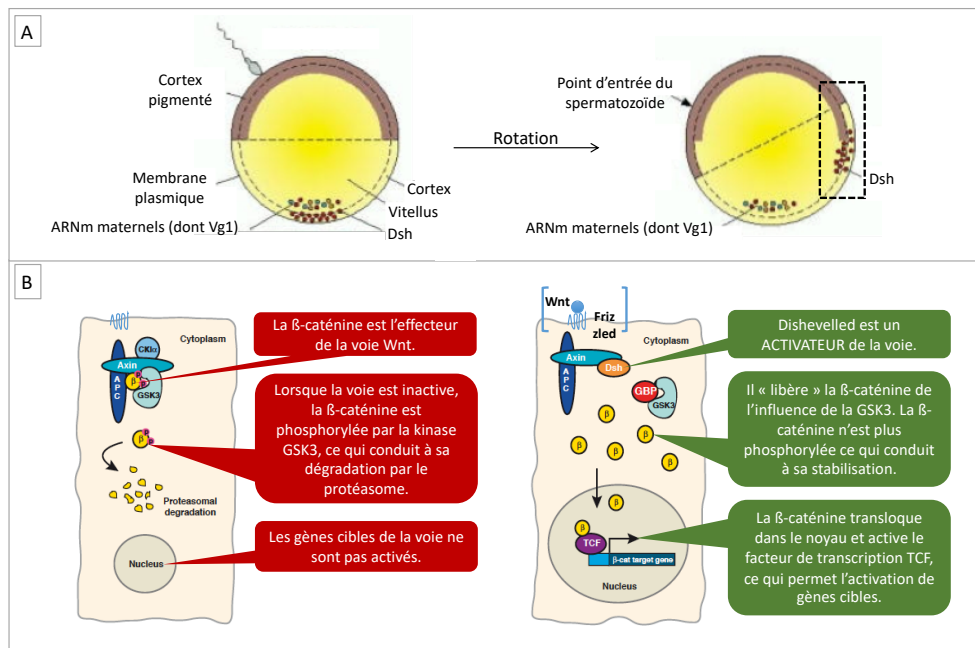


Figure 11 : (A) Relocalisation de la protéine Dsh au cours de la rotation corticale. Le mouvement du cytoplasme cortical entraîne Dsh sur la face opposée au point d'entrée du spermatozoïde (encadré en noir, région dans laquelle se forme le croissant gris). (B) Représentation schématique du fonctionnement de la voie Wnt : voie inactive en rouge ; voie active en vert. Au cours des divisions de la segmentation, les cellules filles qui hériteront de Dsh activeront des gènes cibles de la voie Wnt, pas les autres.

Résumons l'ensemble (Figure 12) :

- Des ARNm et protéines maternels sont répartis asymétriquement dans l'ovocyte au cours de sa maturation. Ils sont hérités de façon différentielle par les cellules filles au cours de la segmentation. Ces déterminants sont ou peuvent coder (i) des facteurs de transcription qui activeront des gènes cibles spécifiques dès que la transcription du génome zygotique débutera (au stade mid-blastula) ou (ii) divers facteurs sécrétés (morphogènes, facteurs de croissance) qui vont contribuer aux premières inductions embryonnaires (cas de Vg1 impliqué dans les étapes précoces de détermination du mésoderme).
- La fécondation génère une asymétrie supplémentaire en relocalisant certains déterminants cytoplasmiques. C'est le cas en particulier de la protéine Dsh qui permet de stabiliser la β -caténine sur la face opposée au point d'entrée du spermatozoïde. Dès que la transcription du génome zygotique débute, les cellules dans lesquelles la β -caténine est active peuvent activer la transcription de gènes cibles spécifiques.
- Un centre organisateur (le centre de Nieuwkoop) est mis en place dès la fécondation. Dans ce centre, l'activité combinée de déterminants cytoplasmiques et de la β -caténine permet l'expression de gènes cibles particuliers conférant à cette région de l'embryon ses propriétés organisatrices.

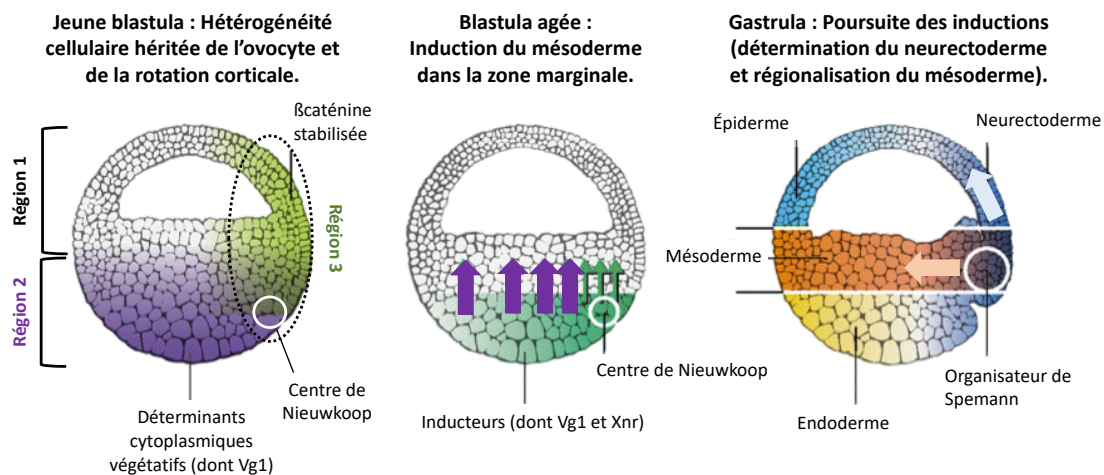


Figure 12 : Au stade jeune blastula, les blastomères sont moléculairement distincts. Sur la base des déterminants cytoplasmiques qu'ils contiennent, on peut schématiquement distinguer 3 grandes régions : une région animale (région 1), une région végétative (région 2) et une région d'activité de la β -caténine (région 3). Un centre organisateur est présent : le centre de Nieuwkoop. Dans la blastula plus âgée, des signaux inducteurs émanant des blastomères végétatifs induisent le mésoderme. Des signaux émanant du centre de Nieuwkoop commencent à fournir aux cellules des informations positionnelles. Ils vont notamment induire un 2^{ème} centre organisateur, dont vous avez entendu parler en L1 et que vous reverrez l'an prochain, l'organisateur de Spemann. Ce dernier est indispensable pour la formation du blastopore et la gastrulation et pour l'émission de signaux morphogènes qui contribueront à fixer les destinées des cellules selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

Rôle morphogène et « organisateur » de l'auxine dans l'embryon d'*Arabidopsis*.

Vous avez vu en [synthèse 5](#) que l'embryon végétal s'organise autour d'un axe de polarité apico-basal. Il est désormais connu que l'auxine joue un rôle fondamental dans la mise en place de cet axe au cours de l'embryogenèse végétale, comme en témoigne le phénotype de mutants de gènes de réponse à l'auxine (Figure 13). Elle est également à l'origine de l'acquisition de la symétrie bilatérale qui caractérise la plantule.

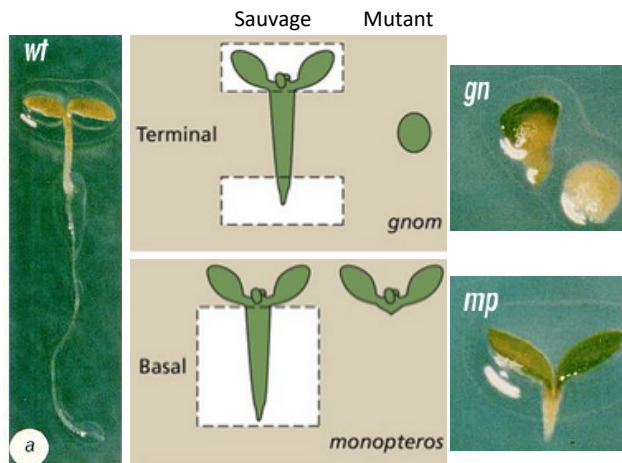


Figure 13 : Phénotype des mutants *Gnom* (*gn*) et *Monopteros* (*mp*). Les gènes *gn* et *mp* sont des cibles de l'auxine. Leur mutation perte de fonction résulte en des défauts de polarité apico-basale (segments manquants le long de l'axe).

L'auxine dans l'embryon établit des gradients complexes et dynamiques. Observez la Figure 14 : on y visualise une accumulation d'auxine d'abord concentrée dans la partie apicale de l'embryon (le proembryon) aux stades 1 et 8 cellules, puis relocalisée au niveau de l'hypophyse et de la partie haute du suspenseur aux stades globulaire et triangulaire.

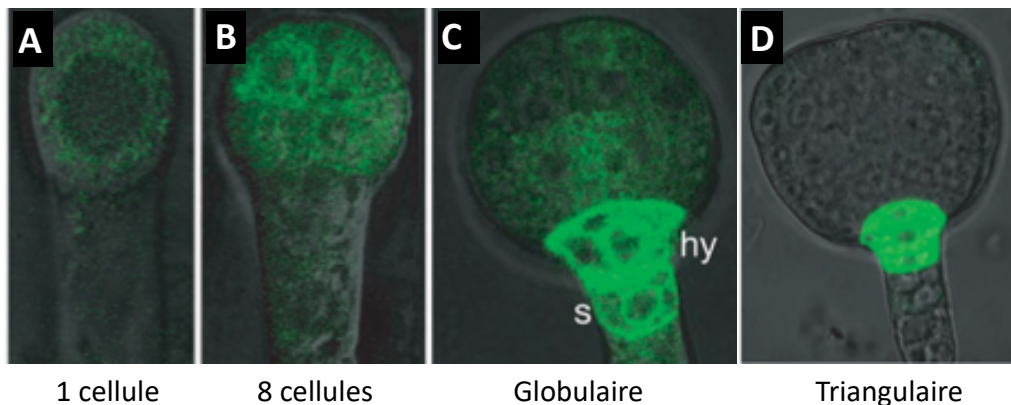


Figure 14 : Accumulation d'auxine dans l'embryon d'*Arabidopsis* à différents stades de développement. L'auxine n'est pas observée directement mais par le biais d'un gène rapporteur placé sous contrôle d'un promoteur sensible à l'auxine (on visualise donc les cellules qui répondent à l'auxine). S : suspenseur ; Hy : hypophyse. D'après *Frimi et al. Nature 2003*.

Comme vous le montre la Figure 15, le transport polarisé de l'auxine via les protéines de la famille PIN (cf [synthèse 2](#)) est la clef d'une telle répartition spatio-temporelle de l'hormone.

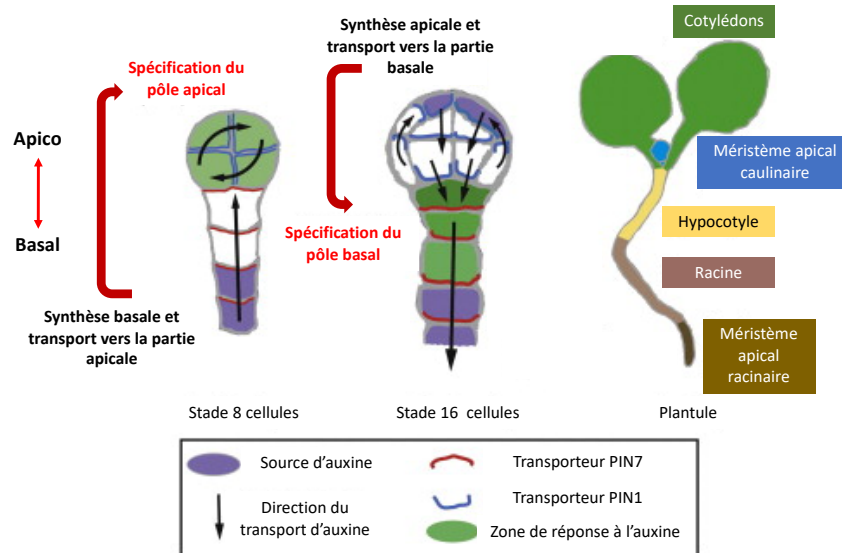


Figure 15 : Représentation schématique de la dynamique de circulation de l'auxine dans l'embryon d'Arabidopsis. Aux stades précoces de développement (ici représenté le stade 8 cellules), l'auxine est synthétisée au pôle basal de l'embryon. Le transport polarisé oriente son accumulation dans la région apicale dont le destin est alors spécifié. Peu après (ici représenté un stade 16 cellules), l'orientation du flux d'auxine s'inverse. La synthèse a désormais majoritairement lieu dans la partie apicale de l'embryon et le transport est polarisé vers la région basale qui est à son tour spécifiée. D'après Robert et al. *Current Biology* 2013.

Inductions embryonnaires tardives : exemple de la détermination des différents territoires somitiques chez les vertébrés.

Comme indiqué précédemment, les phénomènes d'induction ne sont pas limités à l'embryogenèse précoce. Ils se poursuivent tout au long du développement embryonnaire dans chaque tissu/organe en formation. Prenons l'exemple des somites. Vous avez vu en [synthèse 5](#) que ces structures embryonnaires dérivent du mésoderme paraxial et sont à l'origine des muscles, du squelette axial (côtes et vertèbres) et du derme (Figure 16).

La genèse des somites a nécessité de nombreux processus d'induction : induction du mésoderme puis induction du mésoderme paraxial au sein du mésoderme et enfin, induction du mésoderme somitique au sein du mésoderme paraxial. Ça ne s'arrête pas là puisque les somites vont à leur tour être la cible d'inductions permettant leur régionalisation dorso-ventrale en sclérotome (ventral) et dermomyotome (dorsal).

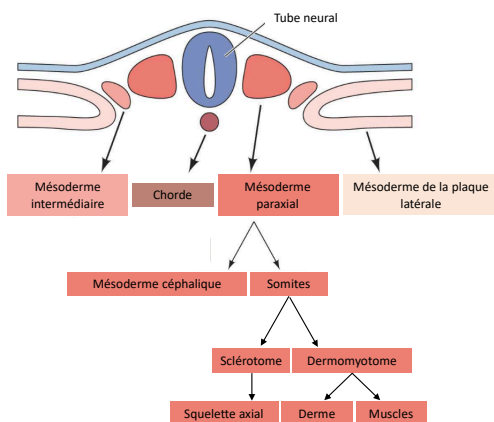


Figure 16 : Lignage du mésoderme paraxial. D'après Gilbert « *Developmental Biology* ».

Nous travaillerons en TD sur les mécanismes inducteurs à l'origine de la détermination du sclérotome et du dermomyotome. Revoyons d'abord les grandes étapes de la formation de ces tissus et leur devenir (Figures 17 et 18).

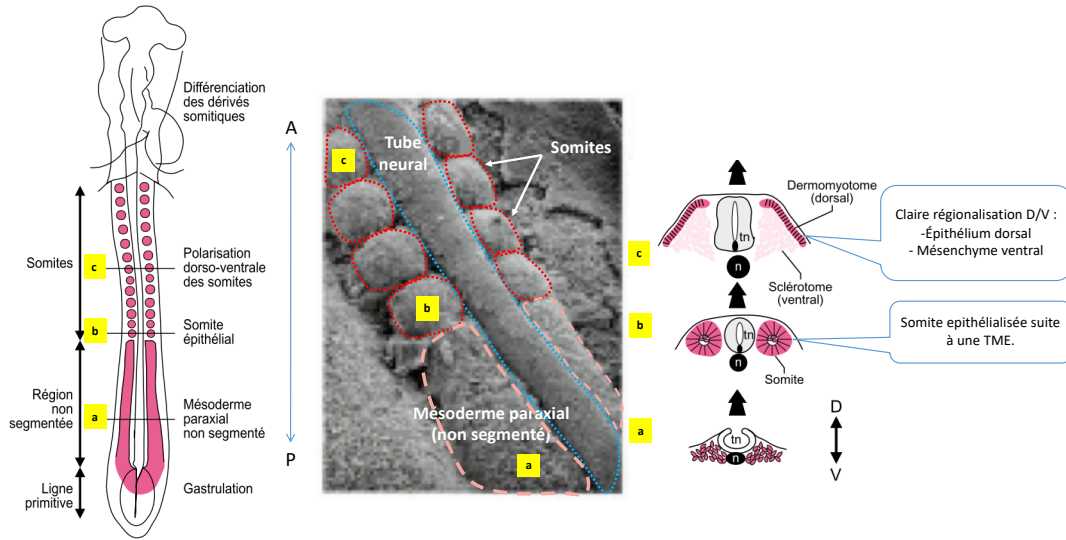


Figure 17 : Rappel sur la formation des somites. **À gauche :** schéma d'embryon de poulet en vue dorsale. **Au centre :** photographie en microscopie électronique à balayage de la région dorsale d'un embryon. **À droite :** schéma de coupes transversales effectuées au niveau des plans a, b, c. Les somites se forment de façon périodique de la région antérieure à la région postérieure par segmentation du mésoderme paraxial (appelé également mésoderme présomitique non segmenté). À un stade donné, on peut donc observer simultanément différents stades de formation des somites : les plus jeunes sont situés postérieurement et les plus âgés antérieurement. L'observation des plans de coupes a et b met en évidence le processus d'épithélialisation des somites : peu après la segmentation d'un nouveau somite, les cellules initialement mésenchymateuses effectuent une transition mésenchymato-épithéliale pour former une jeune somite épithélialisée (TME). L'observation des plans de coupes b et c met en évidence le processus de régionalisation des somites : dans les somites plus âgés une claire régionalisation dorso-ventrale est visible avec un épithélium dorsal (dermomyotome) et un tissu mésenchymateux ventral (sclérotome). La figure 18 montre comment ces deux tissus se sont formés. D'après *Pourquoié, Médecine/Sciences 1997*.

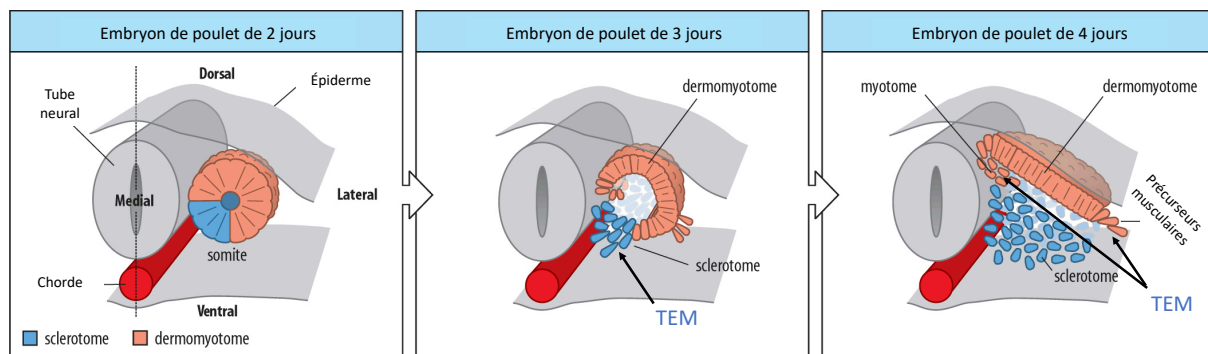


Figure 18 : Régionalisation des somites. Suite à l'épithélialisation (schéma de gauche), la partie ventrale du somite effectue une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) pour former le sclérotome en position ventrale. La partie dorsale reste épithéliale, c'est le dermomyotome (schéma central). Des cellules du dermomyotome vont ensuite effectuer une nouvelle TEM et délaminer (schéma de droite). Ce sont des précurseurs musculaires. Certains vont se différencier localement pour former la musculature dorsale. D'autres vont migrer dans l'embryon pour aller former la musculature du tronc et des membres.

La formation des somites repose donc sur de nombreux processus cellulaires : (i) **segmentation du mésoderme paraxial**, (ii) **épithélialisation** des somites, (iii) **régionalisation dorso-ventrale** faisant intervenir des transitions épithélio-mésenchymateuses successives (genèse du sclérotome puis délamination des précurseurs musculaires à partir du dermomyotome).

Tous ces processus cellulaires sont coordonnés par de multiples signaux inducteurs en provenance des tissus environnants. En particulier, ces signaux contrôlent la détermination du sclérotome et du dermomyotome (Figure 19). Nous reviendrons en TD sur le rôle des signaux émis par la notochorde dans la détermination de ces deux tissus.

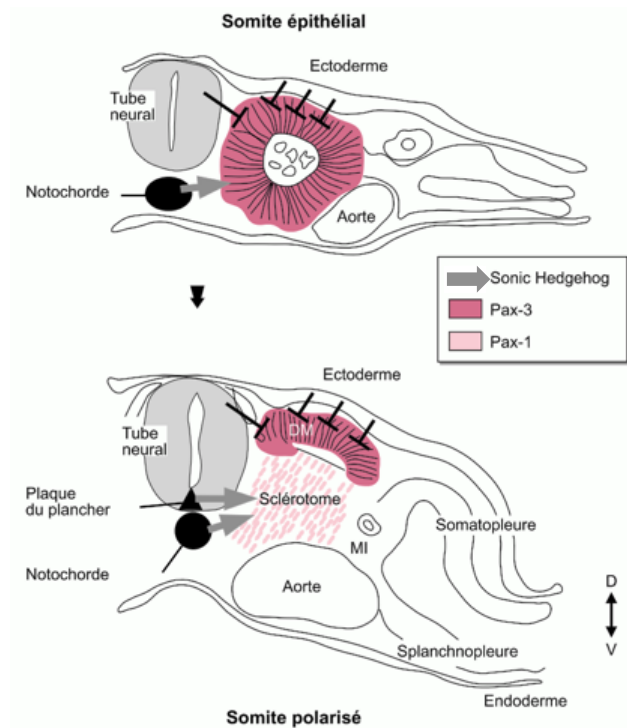


Figure 19 : Les différents territoires somitiques sont induits par des signaux diffusibles en provenance (i) dorsalement : de l'épiderme et de la région dorsale tube neural, (ii) ventralement : de la notochorde puis de la région ventrale du tube neural (Sonic Hedgehog), (iii) latéralement : du mésoderme latéral (non montré sur schéma). Il en résulte l'expression de facteurs de transcription SPÉCIFIQUES qui vont permettre la différenciation des différents dérivés somitiques (comme Pax3 et Pax1 indiqué sur le schéma). D'après *Pourquoi, Médecine/Sciences 1997*.

FICHE METHODOLOGIQUE : Gain et perte de fonction génique dans l'embryon

Vous savez désormais qu'à chaque étape du développement les différents types cellulaires expriment des répertoires spécifiques de gènes. Ainsi, même adjacentes, des cellules peuvent ne pas exprimer les mêmes gènes, ceci en lien avec leur histoire et leur position. Ces gènes codent pour divers types de protéines qui peuvent par exemple être des facteurs de transcription, des protéines sécrétées, des molécules d'adhérence etc...

La génétique du développement s'intéresse à leur fonction au cours de l'embryogenèse ou en période post-embryonnaire. Pour comprendre un processus, quelle que soit l'échelle considérée, macroscopique, tissulaire, cellulaire, il faut en effet accéder à la fonction des gènes exprimés dans les cellules du tissu considéré. Pour ce faire il faut perturber leur expression et donc leur fonction dans les cellules. Il existe différentes stratégies, différentes méthodes. Vous en verrez des exemples au travers d'analyses de documents au cours du TD5.

Démarche générale de l'analyse d'un gain ou d'une perte de fonction

En génétique dite « classique » (du phénotype au gène), l'examen d'un mutant naturel ou généré par mutagenèse au hasard conduit à identifier puis étudier un ou plusieurs gènes *a priori* inconnus. Dans l'approche dite « génétique inverse » présentée ici (du gène à sa fonction), on connaît *a priori* le gène que l'on souhaite étudier et l'on perturbe son expression (selon des méthodes décrites ci-après) pour accéder à sa fonction (Figure 20). Dans cette approche, c'est le fait de connaître la séquence du gène qui permet de le cibler spécifiquement (à l'ère du séquençage des génomes entiers, tous les gènes d'un organisme peuvent être identifiés).

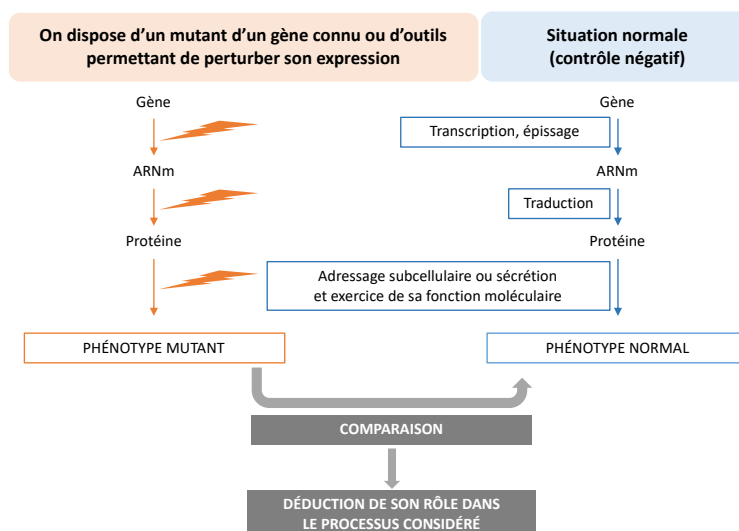


Figure 20 : Représentation schématique de la démarche expérimentale en génétique inverse. Les « éclairs » oranges indiquent les différents niveaux de l'expression génique (du gène à la protéine active), qui peuvent être affectés quand le gène est muté de façon ciblée ou à l'issue d'une perturbation de son expression effectuée par l'expérimentateur. Le phénotype peut être identifié à diverses échelles (moléculaire, cellulaire, tissulaire, organisme entier).

La perturbation de l'expression d'un gène peut consister à :

- 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**.

On note que ce type d'analyse est réalisée 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 (classiquement analysé par hybridation *in situ* ou immunofluorescence) qui permet d'émettre cette hypothèse initiale.

Les outils du gain et de la perte de fonction génique

Une méthode classique de gain de fonction génique consiste à introduire dans les cellules ou tissus ciblés un **vecteur d'expression** (classiquement, un plasmide) contenant un ADN complémentaire (ADNc) du gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire (promoteur actif dans tout type cellulaire ; Figure 21). L'ADNc sera donc transcrit puis les ARNm traduits en protéines. Le gène est surexprimé lorsque l'expression permise par le vecteur s'ajoute à une expression endogène. Il est exprimé de façon ectopique lorsque le vecteur permet une expression dans un tissu où le gène ne s'exprime normalement pas.

Nous verrons plus loin comment ce vecteur peut être introduit dans des cellules ou dans des embryons.

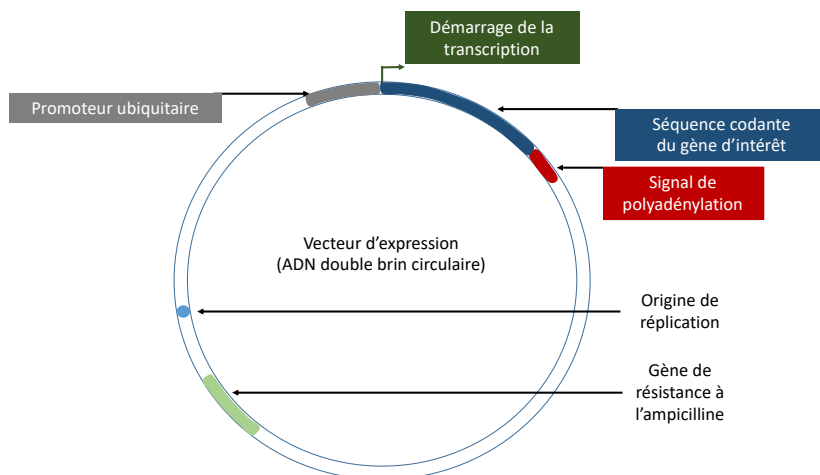


Figure 21 : Représentation schématique d'un vecteur d'expression plasmidique.

Il existe de nombreuses méthodes permettant de réaliser des pertes de fonction génique. Certaines, que nous ne verrons pas cette année, consistent à **directement modifier le génome de cellules ou d'embryons pour muter un gène d'intérêt** afin d'empêcher son expression ou de générer une protéine inactive.

On peut également introduire dans les cellules ou l'embryon des **ARN antisens**, qui, par hybridation avec l'ARNm du gène ciblé vont empêcher sa traduction ou entraîner sa dégradation. Il en résultera une **diminution de l'expression de la protéine (perte de fonction partielle)**. Il existe deux grands types d'ARN antisens utilisés pour ce faire :

- Des **ARN « interférents »** (ARN antisens pouvant être codés par un vecteur d'expression).
- Des oligonucléotides de synthèse chimiquement modifiés appelés « **Morpholinos** » (Figure 22).

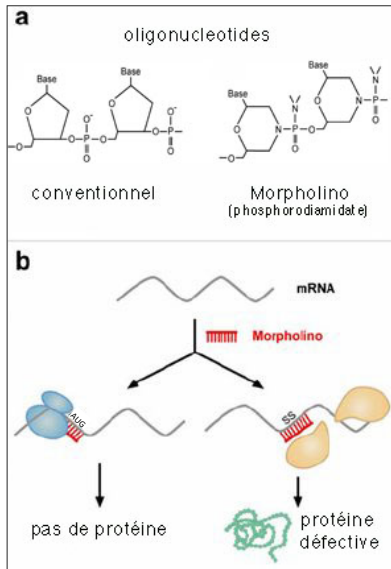


Figure 22 : (A) Comparaison de la structure d'un désoxyribonucléotide conventionnel et d'un oligonucléotide Morpholino. La composition chimique modifiée du Morpholino lui confère une grande stabilité *in vivo*. (B) Les Morpholinos sont conçus pour s'hybrider par complémentarité de base sur des ARNm ciblés. S'ils sont complémentaires de la région contenant le codon initiateur (AUG), la traduction de l'ARNm cible est inhibée (schéma de gauche). Ils peuvent également être conçus pour s'hybrider à des régions contenant un site d'épissage (SS). Ceci conduit à un ARNm incorrectement épissé et une protéine défective (schéma de droite).

Enfin, on peut également réaliser une **perte de fonction partielle en jouant directement sur l'activité de la protéine d'intérêt** :

- En introduisant des **anticorps « bloquants »** qui, par interaction spécifique avec la protéine ciblée, l'empêcheront d'exercer sa fonction.
- En utilisant d'éventuels **inhibiteurs pharmacologiques** de la protéine ciblée.

Les méthodes d'introduction de matériel exogène dans l'embryon

Transférer du matériel génétique exogène dans des cellules en culture est relativement aisé. La technique s'appelle **transfection** et repose sur divers protocoles. On peut par exemple inclure l'ADN ou des ARN interférents dans des liposomes. Ces micelles, qui possèdent des propriétés structurales analogues à celles des membranes cellulaires, vont fusionner avec elles, libérant l'ADN dans la cellule. Transférer du matériel génétique exogène dans des cellules *in vivo* est plus délicat.

Chez certains organismes dont les cellules sont de grandes tailles (comme l'embryon de Xénope aux premiers stades de son développement), on peut directement et facilement **injecter du matériel exogène** (ADN, ARNm, morpholinos, anticorps bloquants) dans une ou plusieurs cellules ciblées. **Seules les cellules filles de la cellule injectée auront une expression génique perturbée** (Figure 23).

Ainsi, une injection dans un unique blastomère de l'embryon de Xénope au stade 2, résulte en un embryon dont une moitié (gauche ou droite) est perturbée et l'autre intacte. Le même individu sert donc à la fois de test (côté injecté) et de contrôle négatif (côté non injecté).

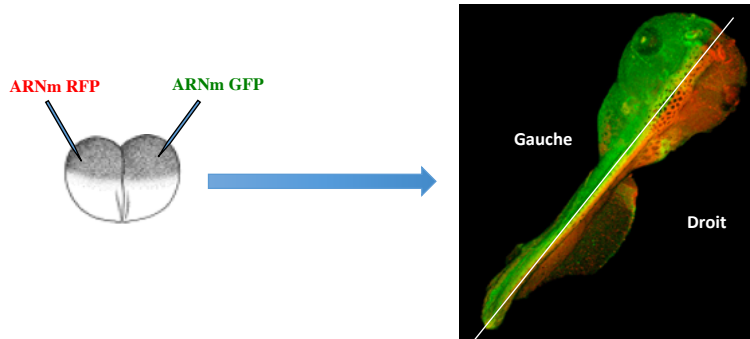


Figure 23 : Principe de l'injection d'ARNm dans l'embryon de Xénope. Le matériel génétique exogène (ici des ARNm codant les protéines fluorescentes RFP et GFP) peut directement être injecté dans les blastomères de l'embryon. Ici l'injection est réalisée au stade 2 cellules dans les deux blastomères. Notez que

toute la moitié gauche de l'embryon dérive du blastomère qui a reçu les ARNm GFP et toute la moitié droite de celui qui a reçu les ARNm RFP. Dans une expérience de gain ou de perte de fonction, les ARNm ou les morpholinos peuvent être injectés dans un unique blastomère en présence d'ARNm codant la β -galactosidase ou une protéine fluorescente. Ces rapporteurs permettront d'identifier les cellules qui dérivent du blastomère injecté.

Plus le développement avance, plus les cellules sont petites, et plus il est difficile de réaliser des injections. La technique d'**électroporation**, utilisée également *in vitro* sur des cellules en culture, est un type de transfection qui peut être réalisée *in vivo* dans l'organisme en développement. Elle consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires qui sont ainsi déstabilisées, ce qui augmente leur perméabilité membranaire. La figure 24 montre sa mise en œuvre sur un embryon d'oiseau. Nous retrouverons cette technique en TD.

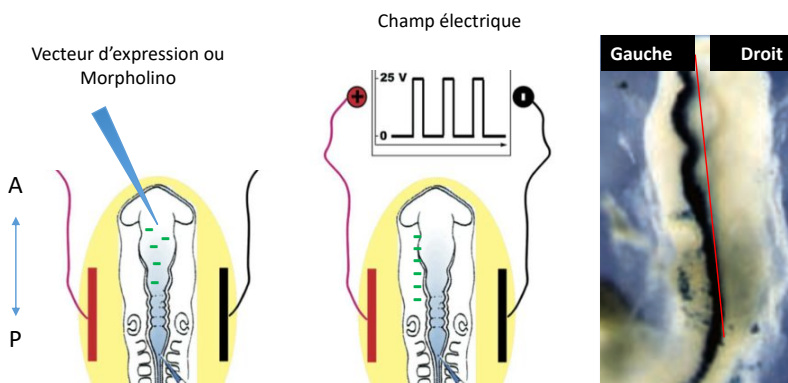


Figure 24 : Principe de l'électroporation dans le tube neural d'embryon de poulet (vues dorsales). Le matériel génétique exogène est injecté dans l'embryon (ici dans la lumière du tube neural). Un champ électrique est ensuite appliqué. Il a pour effet (i) de faire migrer l'ADN ou les morpholinos d'un côté seulement de l'embryon (car

ces molécules sont chargées ; traits verts) et (ii) de les faire rentrer dans les cellules (car le choc électrique a perméabilisé les membranes). La photo de droite montre un embryon électroporé avec un vecteur codant la β -galactosidase. L'activité de l'enzyme a ensuite été révélée par une réaction colorée. Notez que seule la moitié gauche du tube neural exprime la β -galactosidase ; la moitié droite sert de contrôle négatif. Dans une expérience de gain ou de perte de fonction, le vecteur d'expression ou les Morpholinos sont co-injectés avec un vecteur codant la β -galactosidase ou une protéine fluorescente afin d'identifier le côté électroporé.

Analyse du phénotype après un gain ou une perte de fonction génique

Perturber l'expression d'un gène sert à générer un phénotype, à s'écarter de la situation normale en générant des défauts développementaux. **Il faut ensuite caractériser le phénotype résultant pour comprendre/déterminer le rôle du gène considéré** (Figure 20).

Le premier niveau d'observation est souvent macroscopique (l'embryon peut présenter des défauts visibles à l'œil nu comme un défaut de pigmentation, un problème de polarité, une structure manquante ou surnuméraire...). On peut également réaliser des analyses histologiques sur coupes au microscope ou chercher à savoir si l'expression de divers marqueurs d'intérêt est perturbée (par exemple un marqueur de différenciation si l'on soupçonne que la perturbation génique a affecté la différenciation d'un type cellulaire). Les techniques utilisées pour ce faire regroupent notamment la PCR, l'hybridation *in situ* ou l'immunofluorescence. Quelle que soit l'option choisie, la **démarche d'analyse phénotypique** se décline toujours en trois étapes :

- On recense et on qualifie les défauts aux échelles considérées (cellulaire, tissulaire ou macroscopique) par comparaison avec le contrôle.
- On quantifie 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, ...).
- On conclue sur le rôle du gène dans le processus et à l'échelle considérés.

Les analyses de documents que vous devez préparer en vue du TD5 vous fourniront de multiples exemples de perturbations géniques (gain ou perte de fonction) associées à des défauts phénotypiques; elles seront l'occasion de revoir les différentes méthodes présentées ici autour de questions biologiques concrètes.

Notions de nécessité et suffisance ou la conclusion ultime de l'analyse phénotypique

Lorsqu'on réalise une analyse phénotypique, les défauts décrits permettent de **conclure si la fonction du gène est nécessaire et/ou suffisante pour le processus considéré**. Prenons quelques exemples :

- Une mutation perte de fonction du gène A conduit à la perte des membres locomoteurs antérieurs chez la souris. **La conclusion immédiate de ce résultat/phénotype sera : le gène A est nécessaire à la formation des membres antérieurs chez la souris.**
- Une cellule X subit normalement une division asymétrique. L'inhibition de l'expression du gène B promeut la division cette fois-ci symétrique de la cellule X. **On conclue donc que le gène B est nécessaire à la division asymétrique de la cellule X.**
- L'expression ectopique du gène C au niveau du flanc de l'embryon poulet conduit à l'induction d'un membre locomoteur supplémentaire du côté testé. **Conclusion : le gène C est suffisant à la formation d'un membre.**

NB : Ces mêmes termes s'appliquent en conclusion d'expériences d'ablation ou de greffe de cellules ou tissus. Par exemple :

- L'ablation d'un groupe de cellules entraîne l'absence de membres locomoteurs antérieurs chez la souris. **La conclusion immédiate de ce résultat/phénotype sera : ce groupe de cellules est nécessaire à la formation des membres antérieurs chez la souris.**
- La greffe ectopique d'un groupe de cellules induit la formation d'un membre surnuméraire. **La conclusion immédiate de ce résultat/phénotype sera : ce groupe de cellules est suffisant à la formation d'un membre.**

Pour vous faire une idée concrète de la démarche expérimentale en génétique inverse, allez voir ce TP virtuel qui vise à analyser le rôle du gène *Pax8* sur la formation du rein embryonnaire chez le Xénope :

https://rnbio.upmc.fr/tp_xenope#Pr%C3%A9sentation_du_TP_x%C3%A9nope