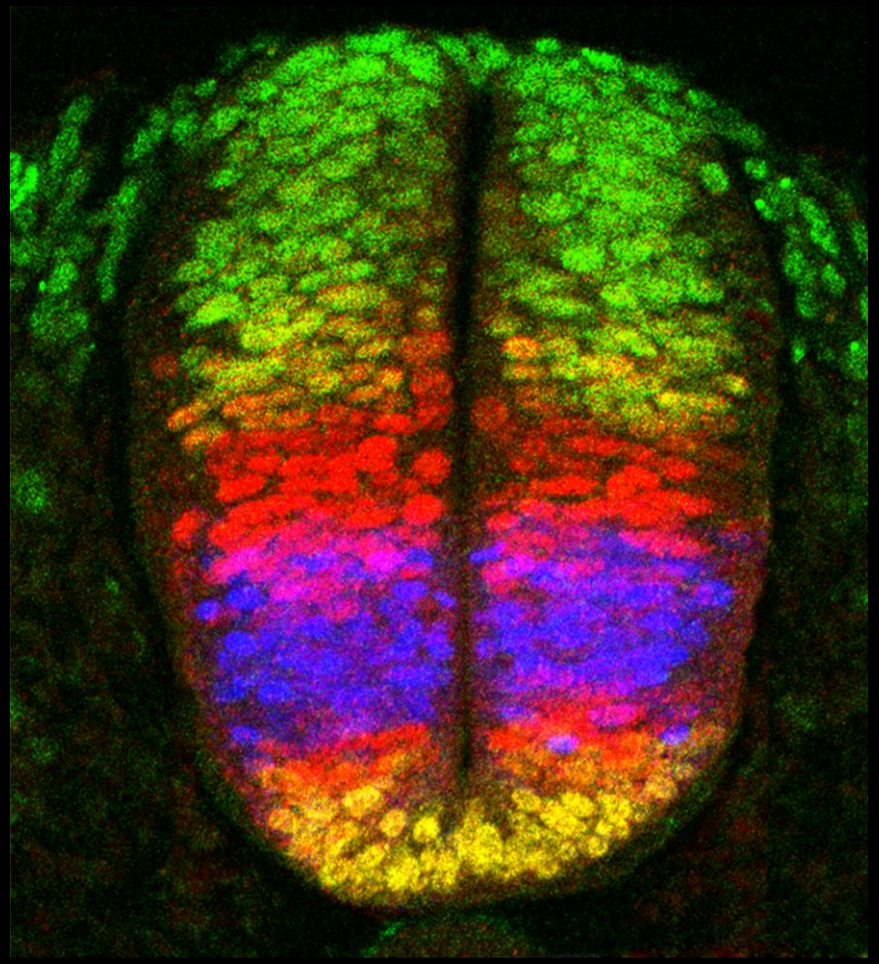
Signalisations au cours du développement des Vertébrés 2

Patrick PLA
Université Paris Saclay

https://bcgdevelop.fr/



Partie 3
Généralisation : la notion de morphogène

Alan Turing (à 16 ans sur la photo)
(1912-1954)
Après avoir déchiffré le code de la machine allemande Enigma au cours de la seconde guerre mondiale, Turing s'est intéressé à en 1952 aux équations de réaction-diffusion, puis a élaboré un modèle biomathématique de la morphogenèse, applicable aux animaux ou aux végétaux. Il fait paraître un article à ce sujet, «*The Chemical Basis of Morphogenesis*» (*Philosophical Transactions of the Royal Society*, août 1952)

Mise en évidence *in vitro* d'un morphogène

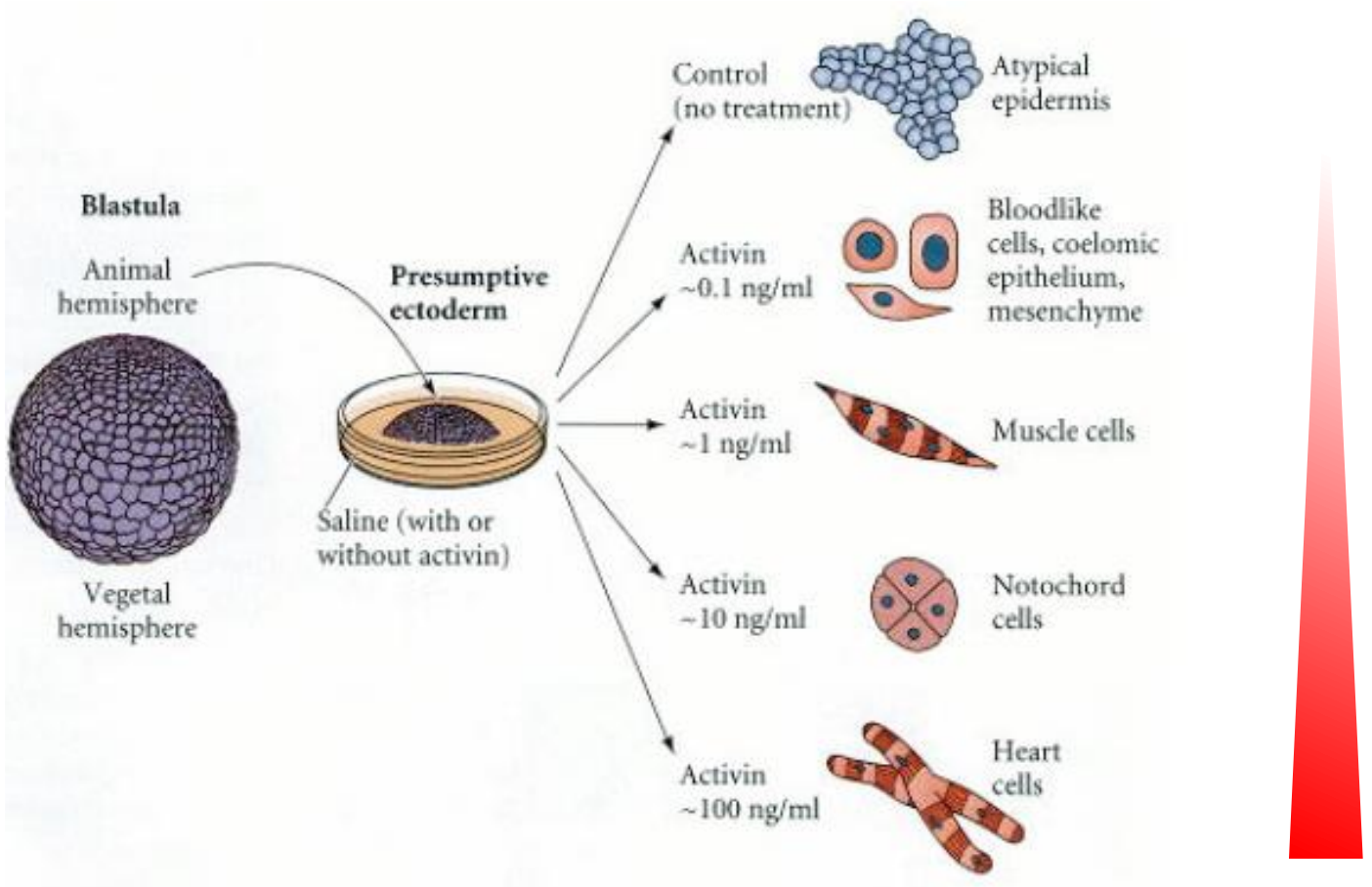
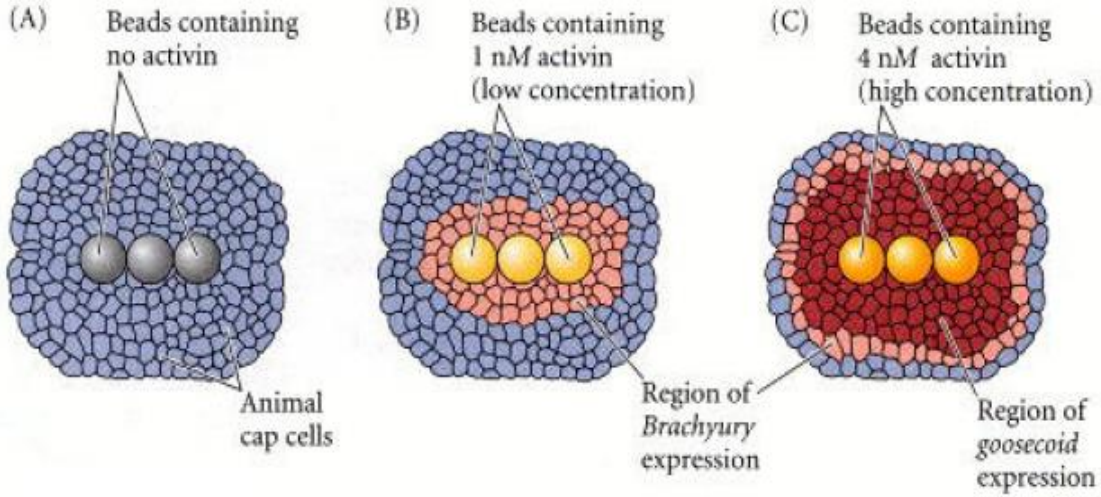
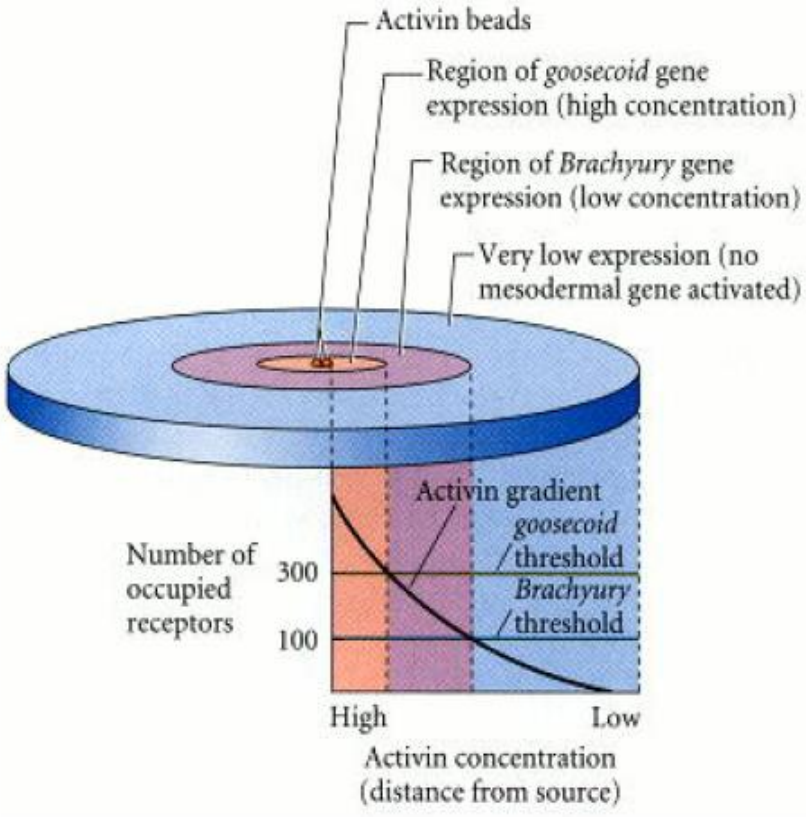


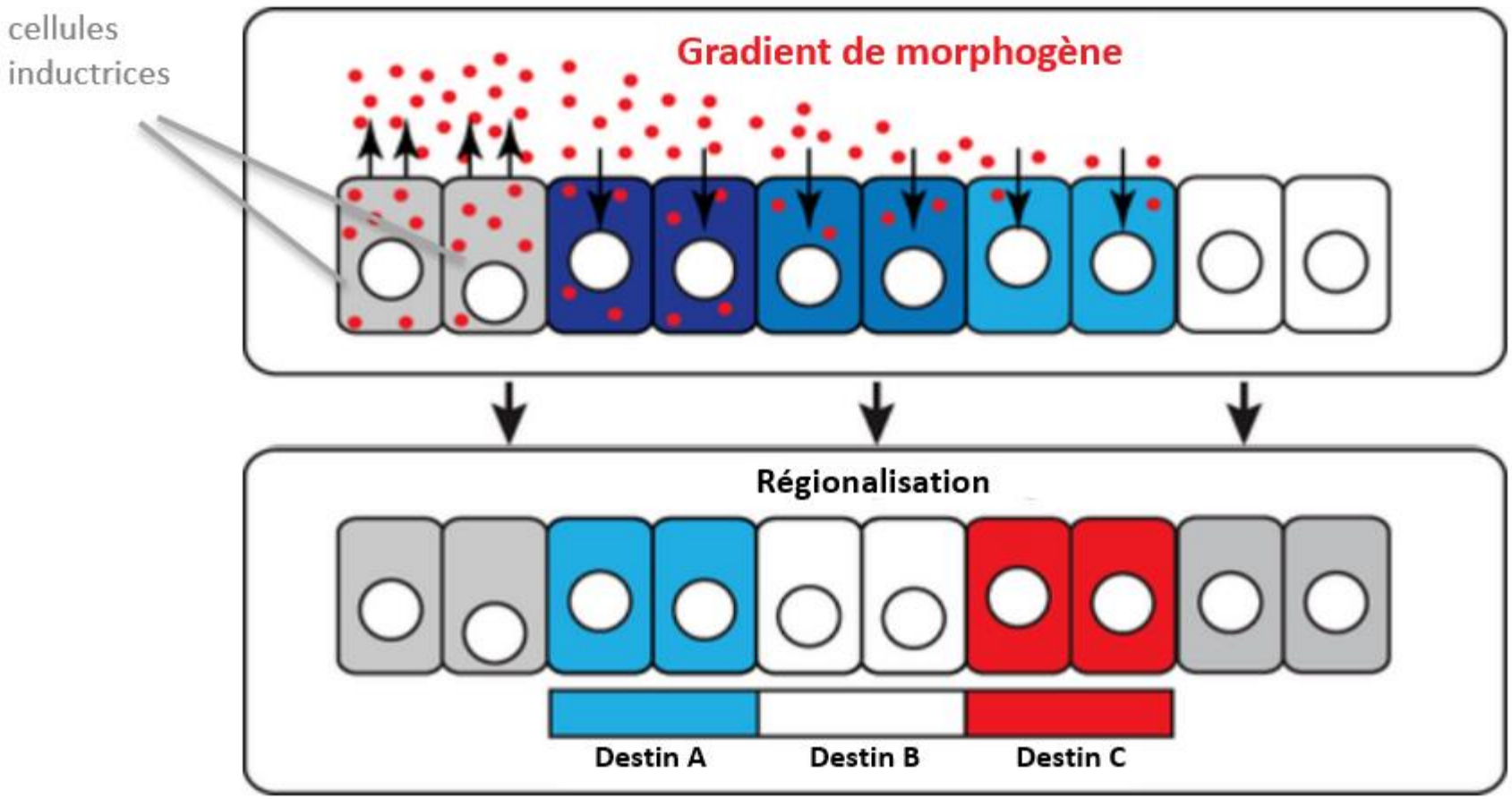
Figure 3.20. Activin (or a closely related compound such as Nodal) is thought to be responsible for converting animal hemisphere cells into mesoderm. When animal cap cells were removed from *Xenopus* blastulae and placed in saline solutions containing activin, the activin conferred different fates on the cells at different concentrations. (After Fukui and Asashima 1994.)

Mise en évidence *in vitro* du gradient d'un morphogène

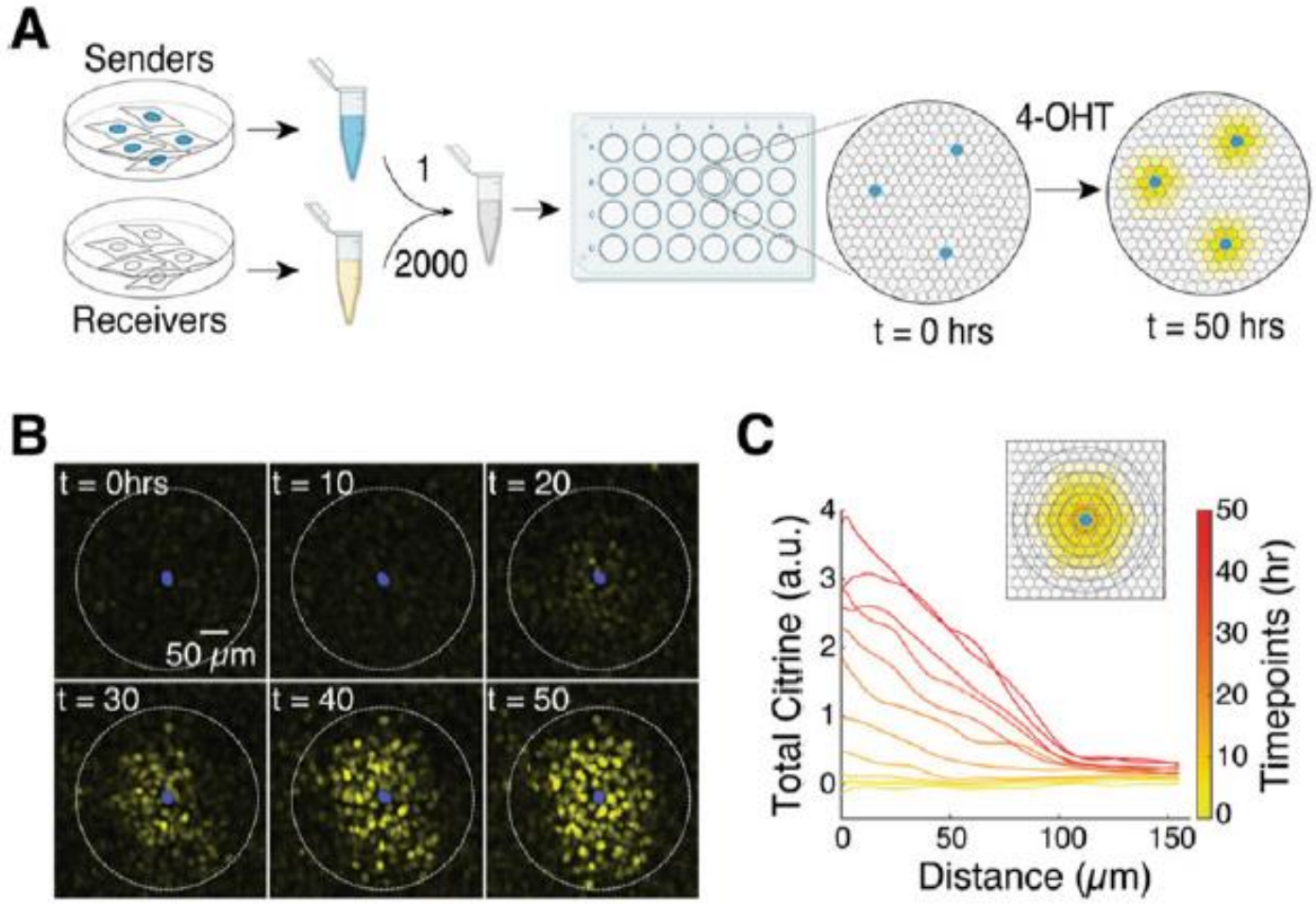




Le modèle du drapeau français pour les morphogènes

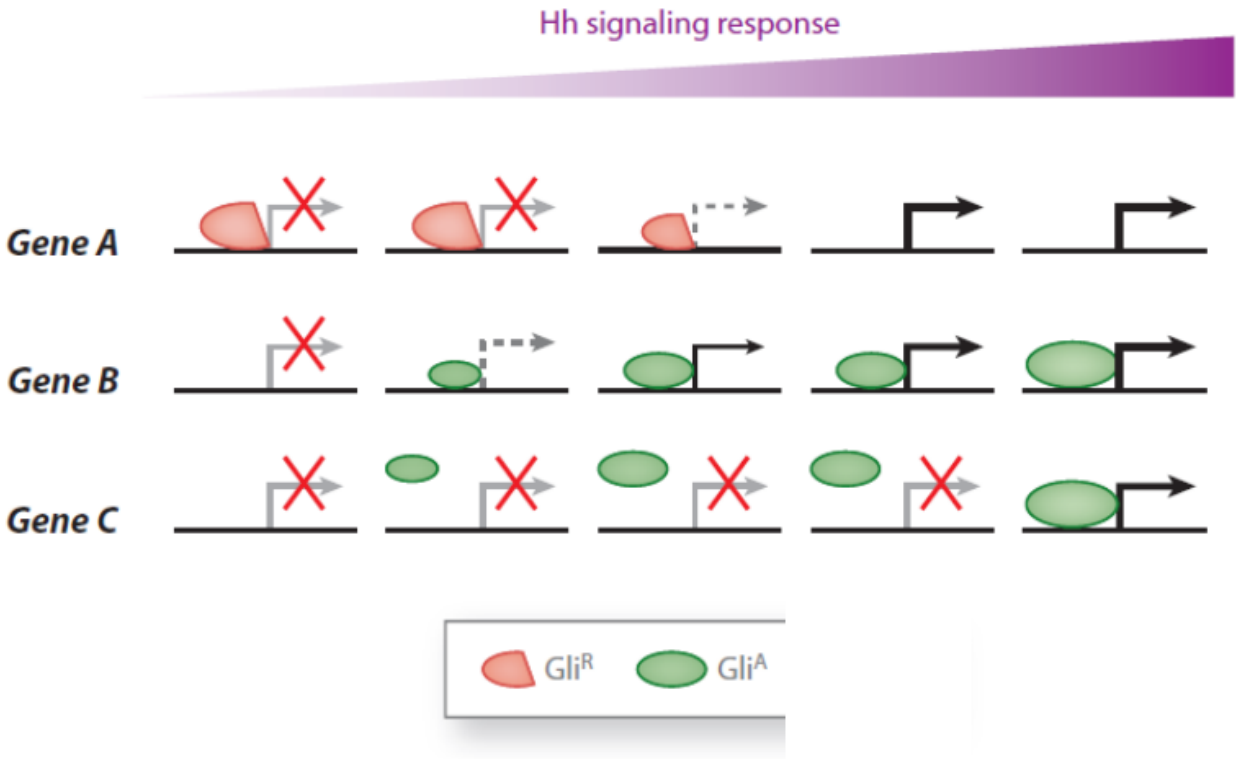


Modélisation d'un gradient de morphogène et de la réponse à ce gradient *in vitro*



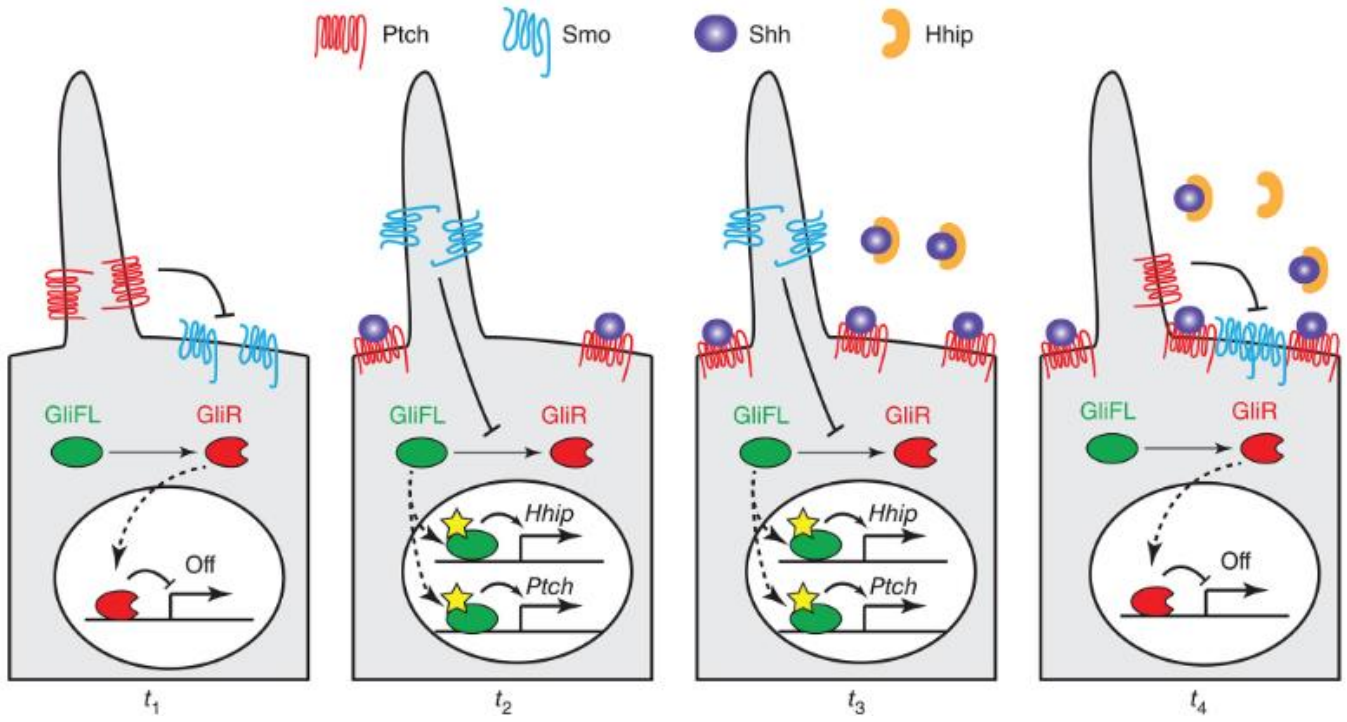
Des cellules appelées productrices de morphogènes (senders, cellules bleues) sont transfectées avec un vecteur d'expression leur permettant de produire Sonic Hedgehog (Shh) de manière inductible par le tamoxifène (4-OHT). Des cellules appelées réceptrices (receivers) sont transfectées avec un vecteur d'expression leur permettant d'exprimer un gène rapporteur (la mCitrine, fluorescence jaune) sous le contrôle de séquences régulatrices activées par Gli, la famille de facteur de transcription dont l'activité stimulatrice de la transcription est activée en réponse à la réception de Shh. Les deux populations de cellules sont mélangées selon un ratio de 1/2000, et on suit la fluorescence de la mCitrine au cours du temps.
Source : https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1174-6

Différentes réponses en fonction de la dose de Hedgehog selon l'état activateur ou répresseur des Gli



Les cellules compétentes à recevoir le signal Hedgehog (Hh) hébergent des rapports variables de Gli^R et Gli^A, ce qui se traduit par l'activation transcriptionnelle différentielle de gènes cibles de Gli. En l'absence de Hh, la majorité des Gli existent sous forme de Gli^R, ce qui conduit à la répression d'un sous-ensemble de gènes cibles Gli (gène A), et la protéine Gli pleine longueur est maintenue inactive par des mécanismes inhibiteurs. Le gène A est déréprimé lorsque les niveaux de Gli^R sont réduits en réponse à la stimulation Hh. La signalisation Hh conduit à l'activation de protéine Gli pleine longueur préexistante (formant Gli^A), ce qui entraîne la transcription du gène B, que de faibles niveaux de Gli^A peuvent activer. Le gène C est transcrit plus tard lorsque des niveaux plus élevés de Gli^A sont présents

Une boucle de rétroaction négative conduit à une désensibilisation des cellules cibles à Shh



En l'absence de ligand (t 1), les récepteurs Ptch1 bloquent l'entrée de Smo dans le cil primaire. Cela conduit à la dégradation protéasomale de Gli pleine longueur (GliFL) en sa version répressive (GliR). Lors de l'exposition aux ligands Shh (t 2), Shh se lie à Ptch1 et inhibe son activité, de sorte que Smo peut entrer dans le cil. L'activité Smo bloque le traitement de Gli conduisant à la stabilisation et à l'activation de GliFL, qui active les gènes cibles dans le noyau. Parmi les gènes cibles de Gli se trouvent Hhip1 et Ptch1, qui codent des régulateurs négatifs de l'activité de la voie Shh. Par conséquent, les niveaux de ligands Hh doivent augmenter continuellement pour compenser les concentrations croissantes de Hhip1 et du récepteur Ptch1 (t 3). Si cela n'a pas lieu, cela entraîne la séquestration des ligands Shh par Hhip1 et par une répression trop forte de Ptch1 sur Smo ce qui entraîne l'inactivation de la voie (t 4).

https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wdev.271

Partie 3
Généralisation : la notion de morphogène

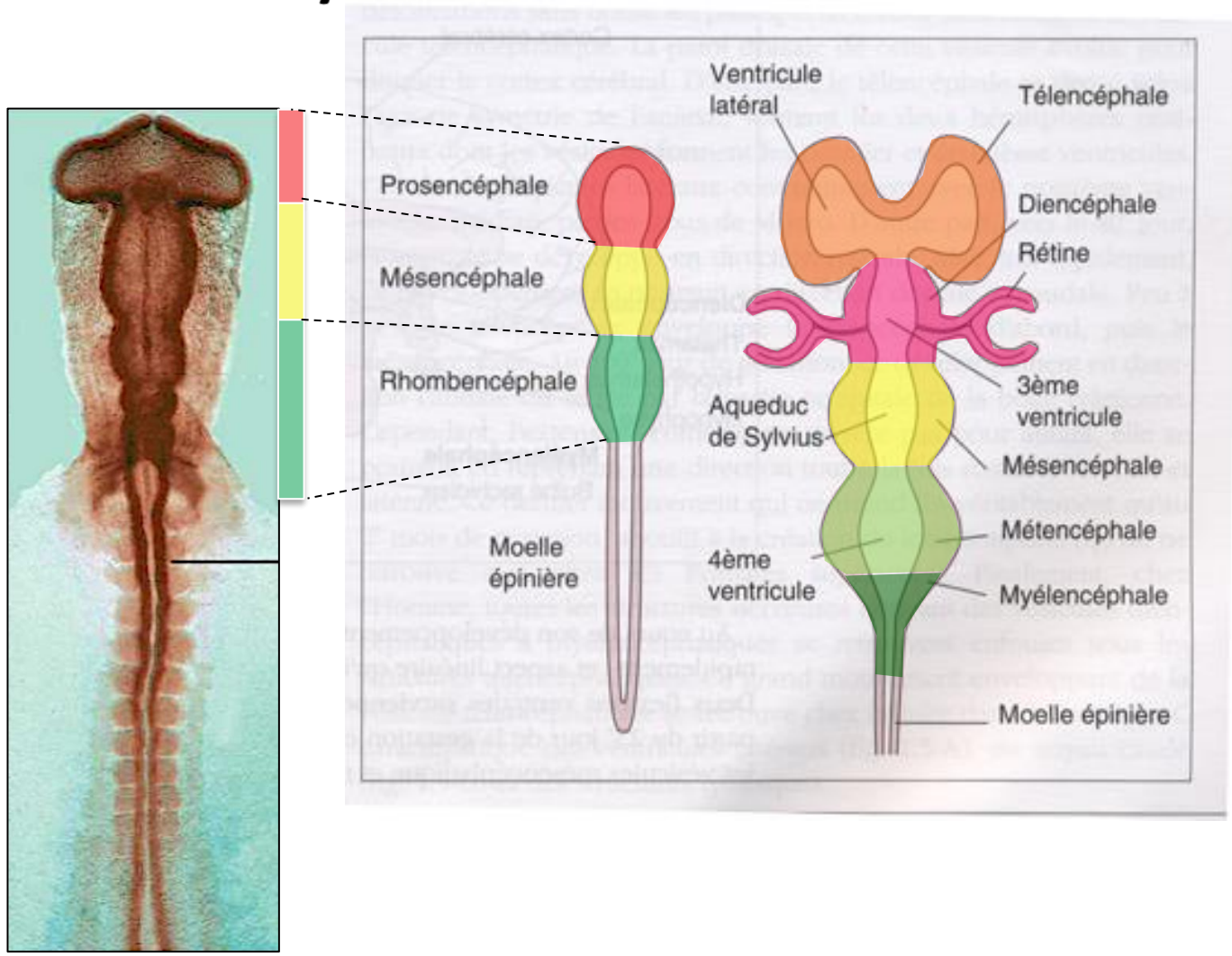
Les morphogènes sont des molécules (généralement des protéines secrétées)
qui diffusent à travers les tissus embryonnaires,
et qui établissent un gradient de concentration
qui instruit les cellules réceptrices sur leur position et leur identité.

Cela implique une interprétation dose-dépendante par les cellules cibles, et l'activation de programmes génétiques distincts à différents seuils de concentration.

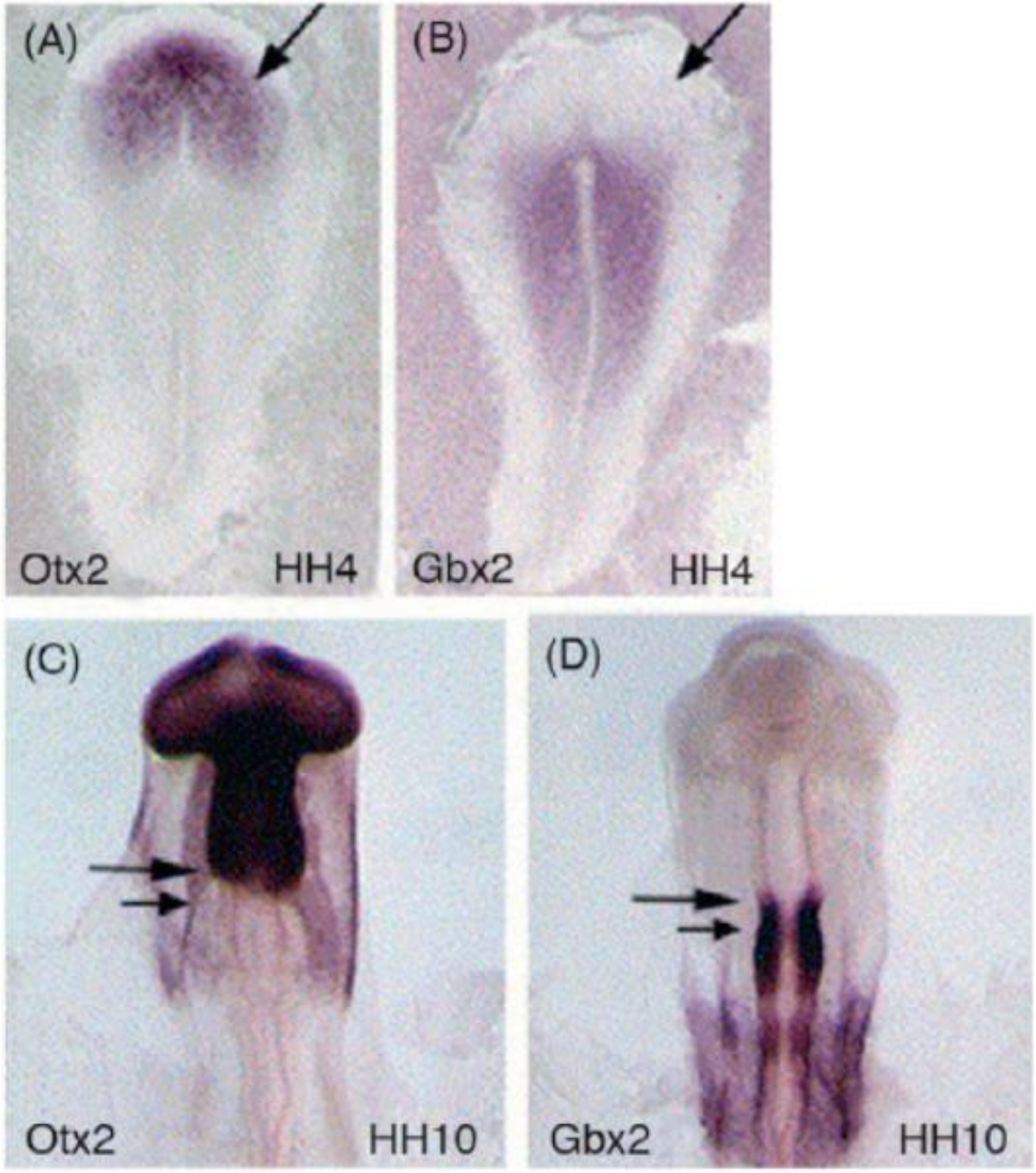
Les cellules cibles ne restent pas « passives » au signal reçu. Des mécanismes de rétroaction peuvent par exemple modifier la compétence des cellules cibles à répondre à une dose donnée de morphogène.

Partie 4
La régionalisation antéro-postérieure du tube neural

Régionalisation antéro-postérieure du système nerveux central



Patron d'expression de *Otx2* et *Gbx2* dans le tube neural antérieur chez l'embryon de poulet

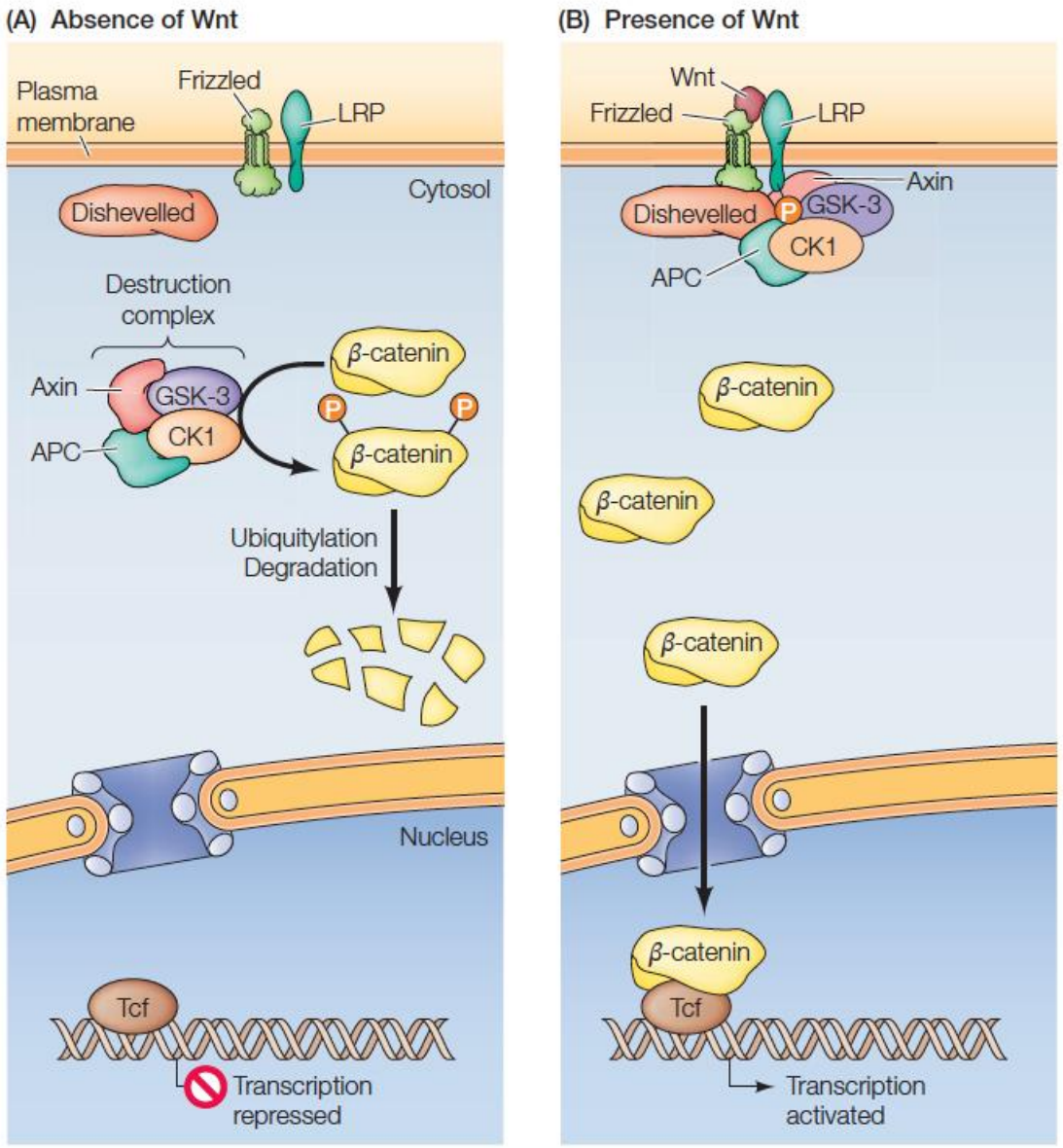


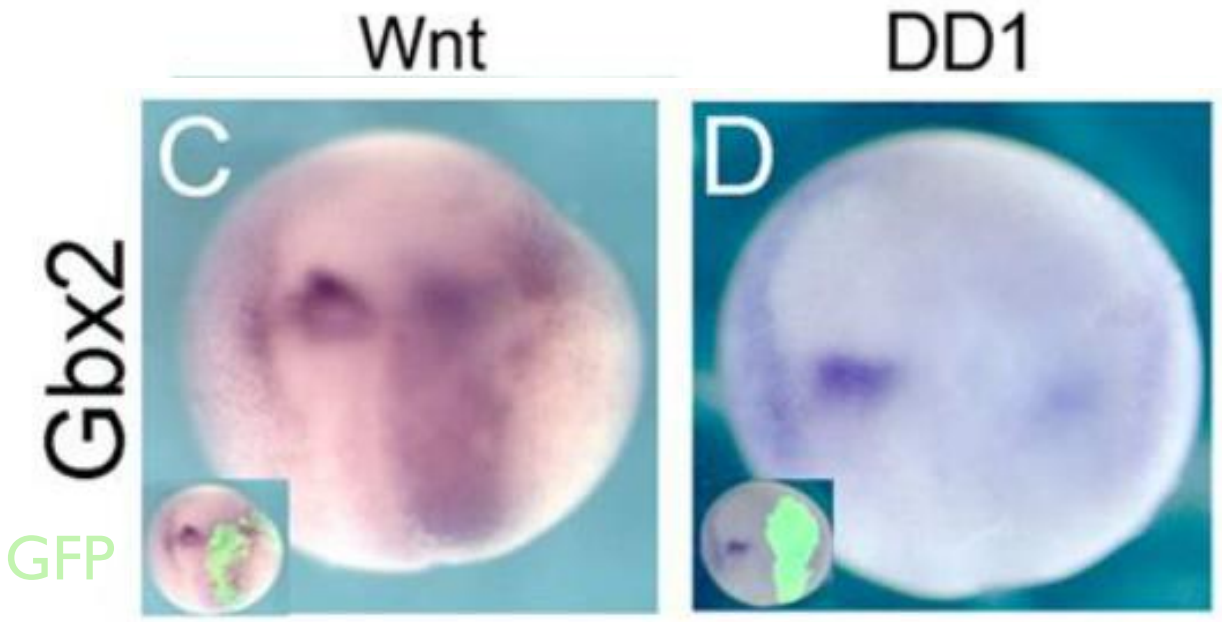
Hybridation in situ avec une sonde reconnaissant l'ARNm de *Otx2* (A, C) ou de *Gbx2* (B, D) dans des embryons de poulet aux stades HH4 et 10. Au stade HH4, *Otx2* est exprimé dans la plaque neurale antérieure tandis que *Gbx2* est exprimé plus postérieurement. Au stade HH10, *Otx2* est exprimé à l'avant jusqu'à la limite mésencéphale/métencéphale (grande flèche) alors que *Gbx2* est exprimé dans le cerveau postérieur (métencéphale et rhombencéphale).

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/neu.20248

La voie de signalisation canonique Wnt-β-catenin

Figure 17.29 The Wnt pathway
(A) In the absence of Wnt, β-catenin is phosphorylated by GSK-3 in a complex with casein kinase-1, axin, and APC (the destruction complex), leading to β-catenin ubiquitylation and degradation. (B) Wnt polypeptides bind to Frizzled and LRP receptors, leading to recruitment of Dishevelled, inactivation of the destruction complex, and stabilization of β-catenin. β-catenin then translocates to the nucleus and forms a complex with Tcf transcription factors, converting them from repressors to activators of their target genes.

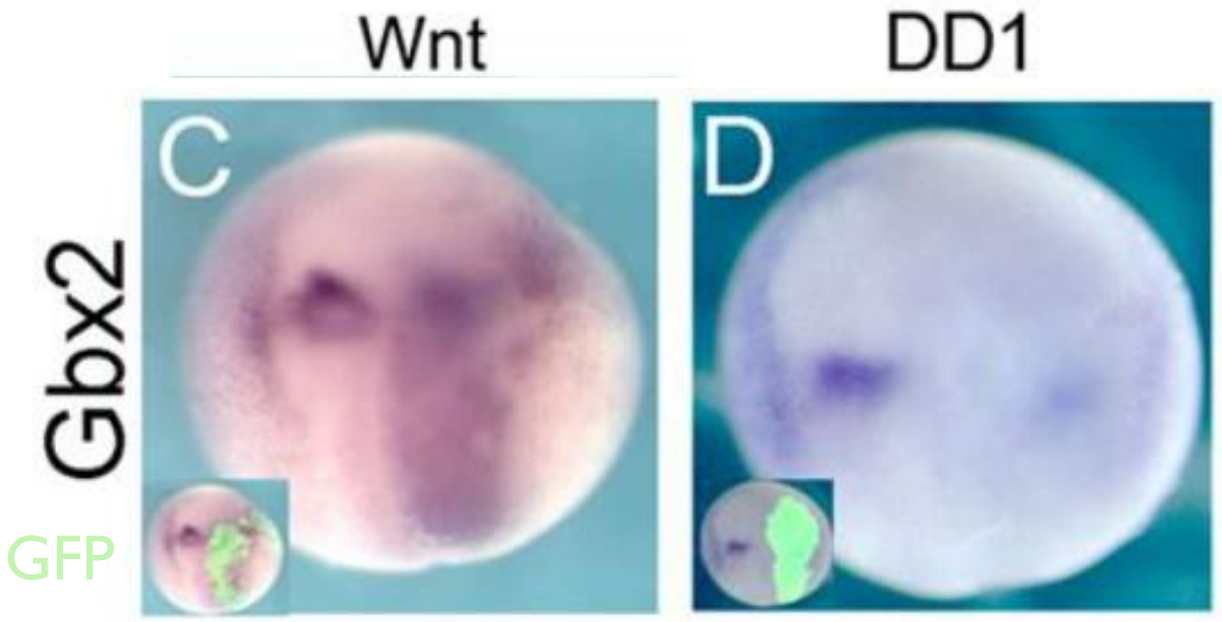




Des embryons de xénope sont injectés avec des ARNm Wnt8 (C) ou d'une forme dominante-négative de Dishevelled (DD1) ce qui inhibe la voie Wnt (D) ainsi qu'avec un ARNm de GFP. Ils sont fixés au stade neurula et traités en hybridation *in situ* avec une sonde reconnaissant l'ARNm de *Gbx2*. Le côté injecté est reconnu grâce à la fluorescence de la GFP (encart en bas à gauche).

https://journals.biologists.com/dev/article/136/19/3267/65330/The-posteriorizing-gene-Gbx2-is-a-direct-target-of

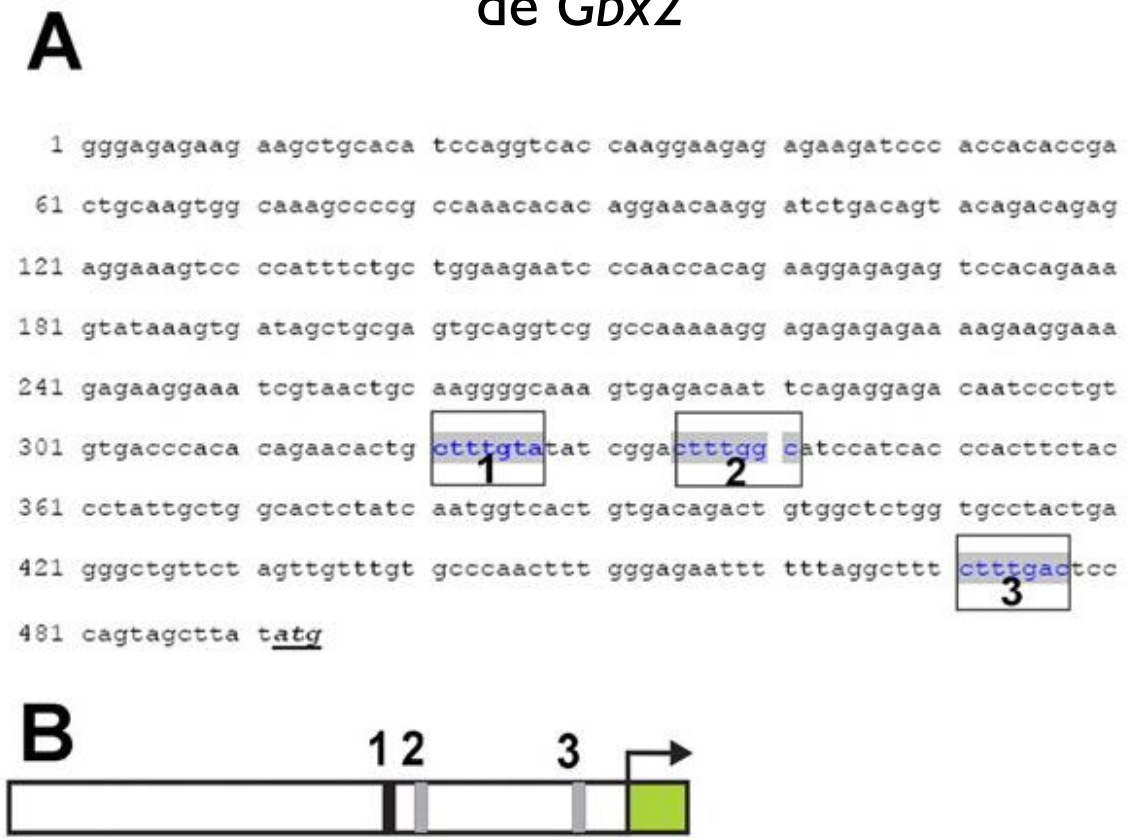
La voie Wnt est nécessaire et suffisante pour stimuler l'expression de *Gbx2*



Des embryons de xénope sont injectés avec des ARNm Wnt8 (C) ou d'une forme dominante-négative de Dishevelled (DD1) ce qui inhibe la voie Wnt (D) ainsi qu'avec un ARNm de GFP. Ils sont fixés au stade neurula et traités en hybridation *in situ* avec une sonde reconnaissant l'ARNm de *Gbx2*. Le côté injecté est reconnu grâce à la fluorescence de la GFP (encart en bas à gauche).

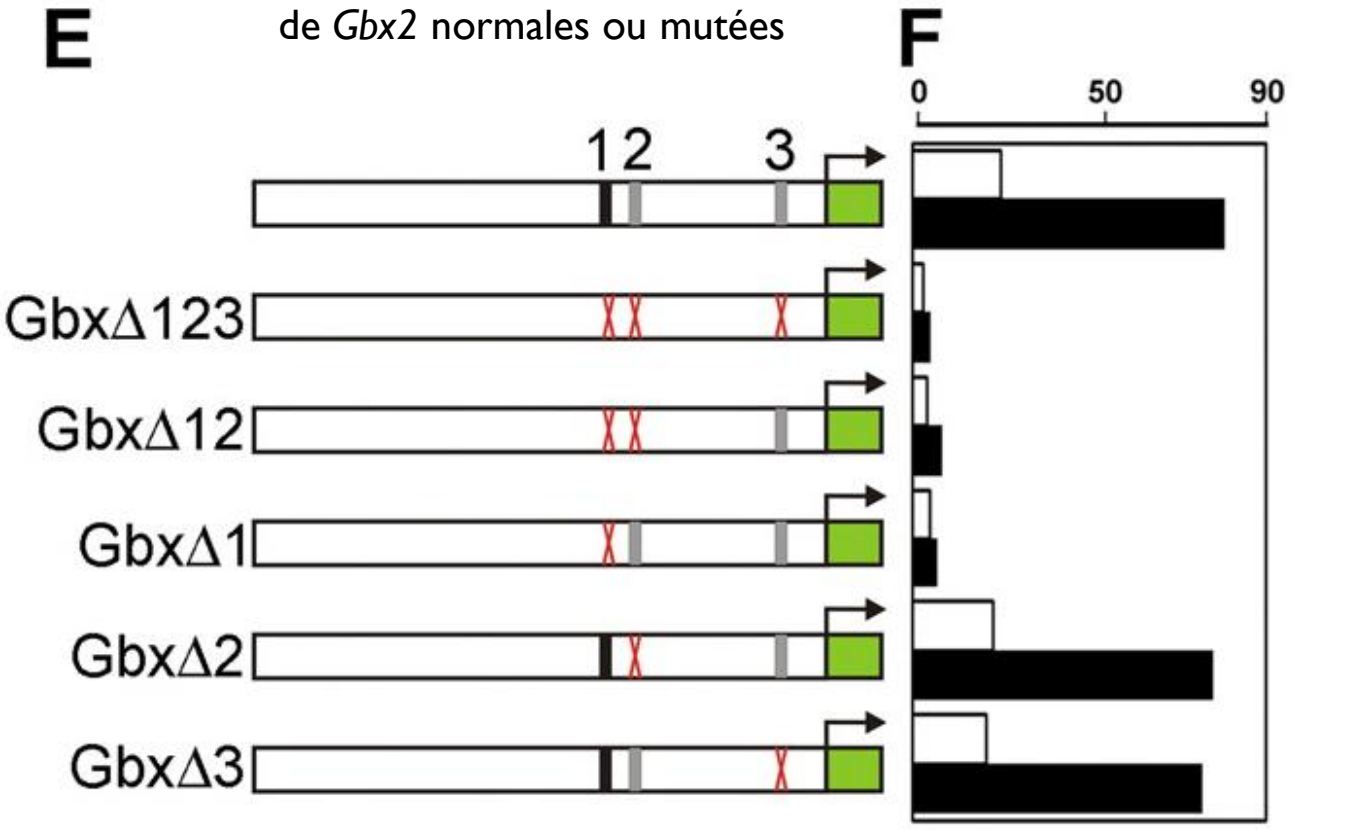
https://journals.biologists.com/dev/article/136/19/3267/65330/The-posteriorizing-gene-Gbx2-is-a-direct-target-of

Séquences régulatrices de *Gbx2*



GFP sous le contrôle de séquences régulatrices de *Gbx2* normales ou mutées

% d'embryons transgéniques présentant une expression de GFP



1, 2, 3 = sites possibles de fixation de LEF/TCF

https://journals.biologists.com/dev/article/136/19/3267/65330/The-posteriorizing-gene-Gbx2-is-a-direct-target-of

❶

Induction neurale

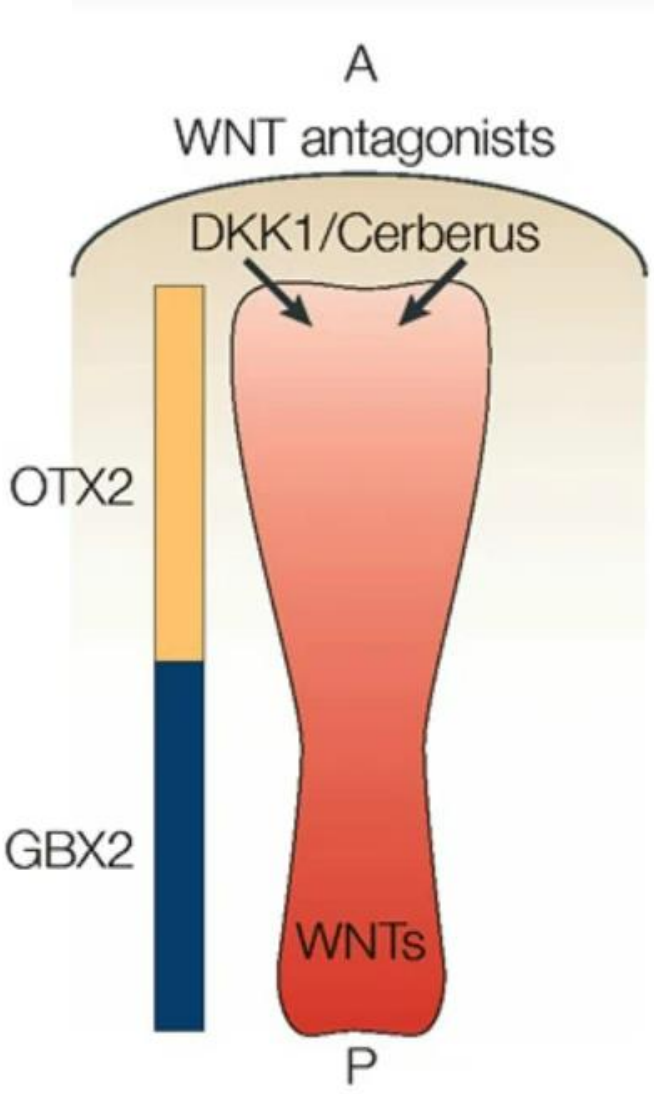
Otx2

❷

A P

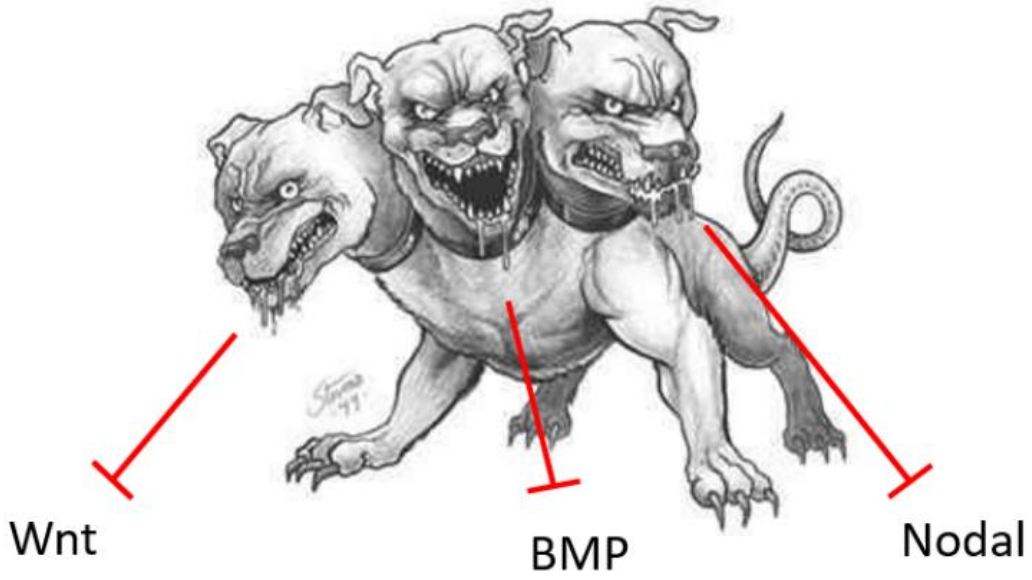
Otx2 ⊣ *Gbx2* ← Wnt

Des inhibiteurs de Wnt assurent qu'ils ne pourront pas agir dans la région antérieure



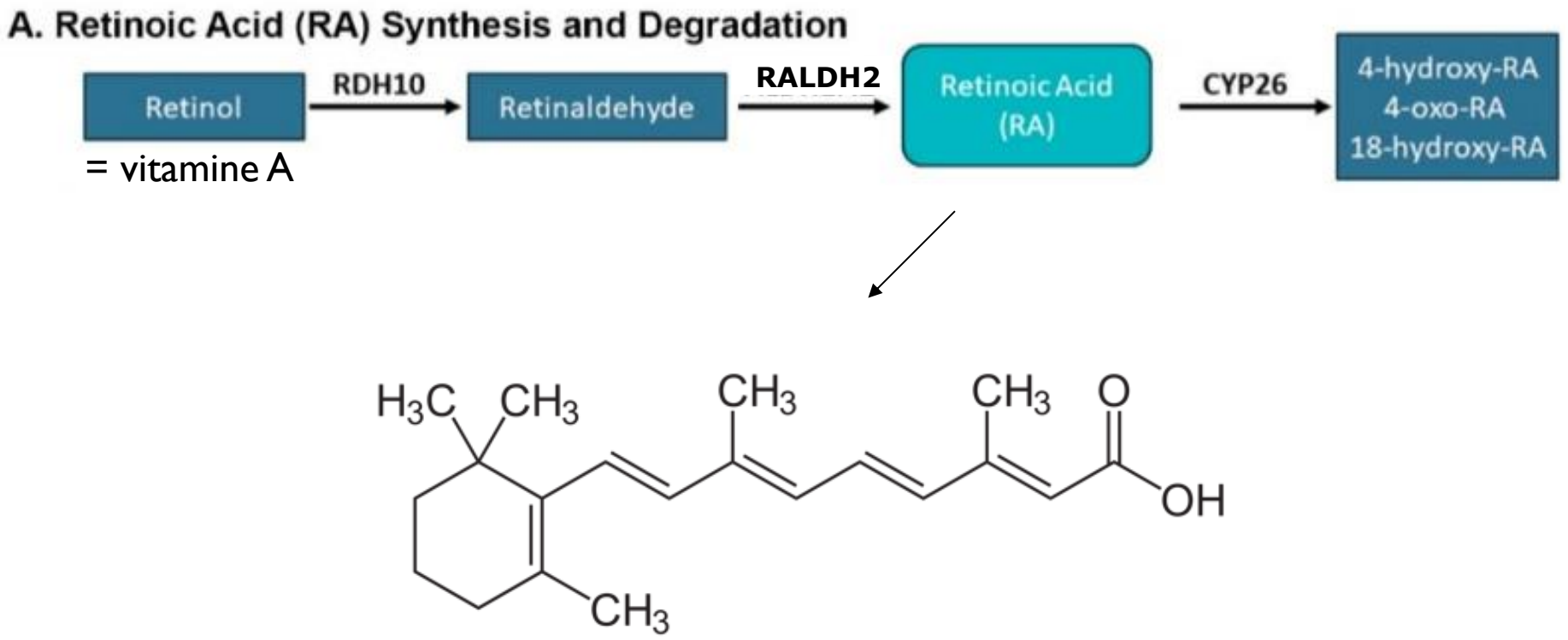
DKK1 (Dickkopf-1) inhibe le co-récepteur LRP

Quant à Cerberus...



https://www.nature.com/articles/nrn1665

L'acide rétinoïque

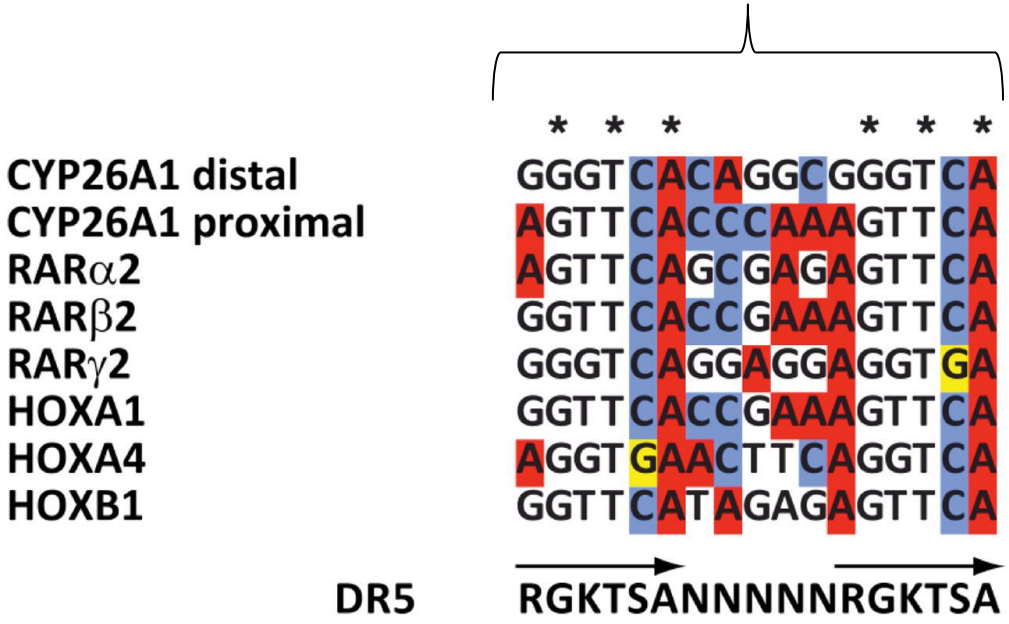


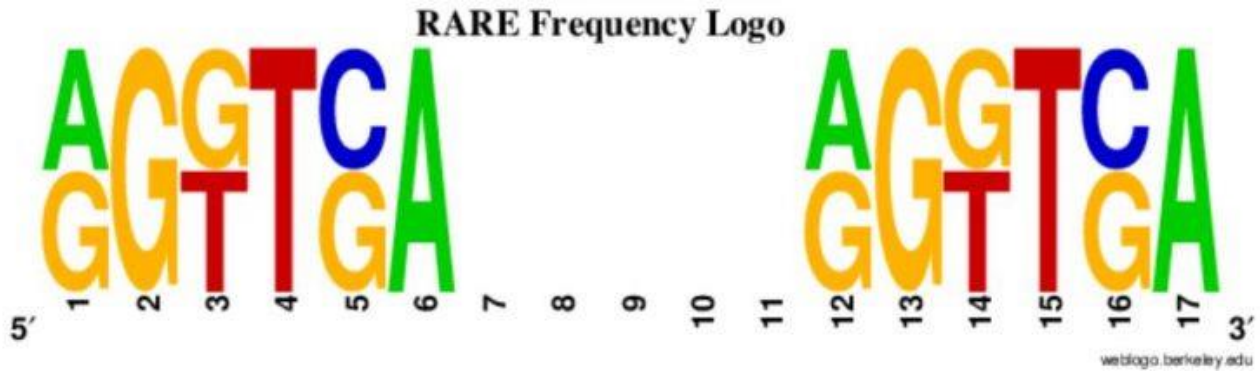
= vitamine A

RALDH2 = rétinaldéhyde déshydrogénase

Les récepteurs intracellulaires à l'acide rétinoïque se fixent sur des séquences spécifiques de l'ADN

Séquences régulatrices sur lesquelles se fixent les récepteurs à l'acide rétinoïque



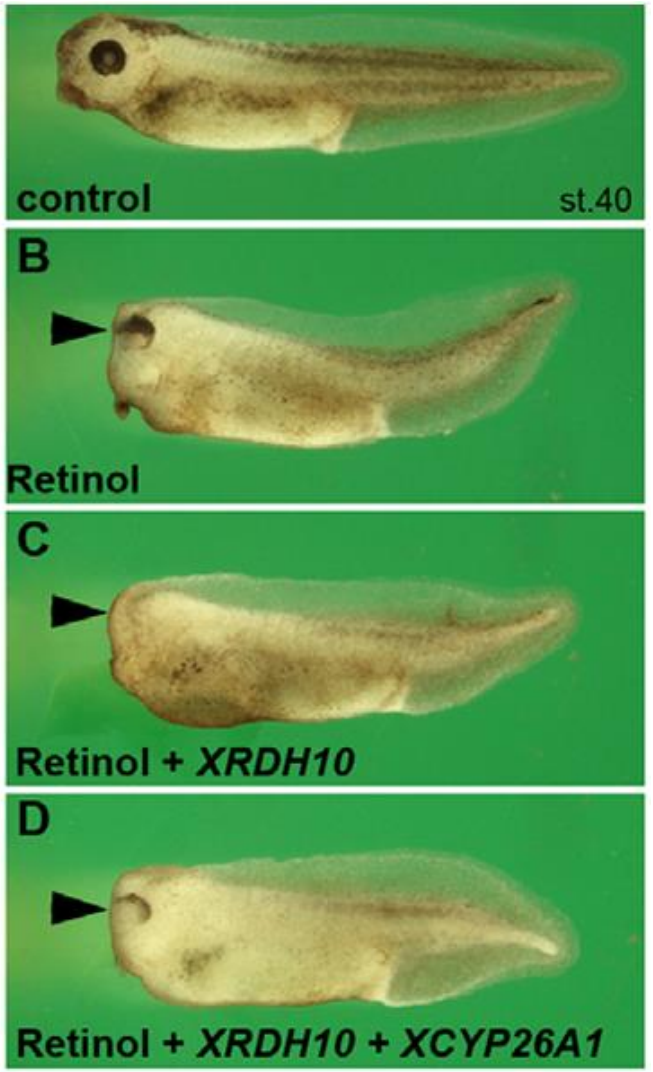


Traitement
à l'acide
rétinoïque

L’acide rétinoïque est un morphogène postériorisant (cas d’un morphogène qui n’est pas une protéine secrétée !)

Traitement à l’acide rétinoïque

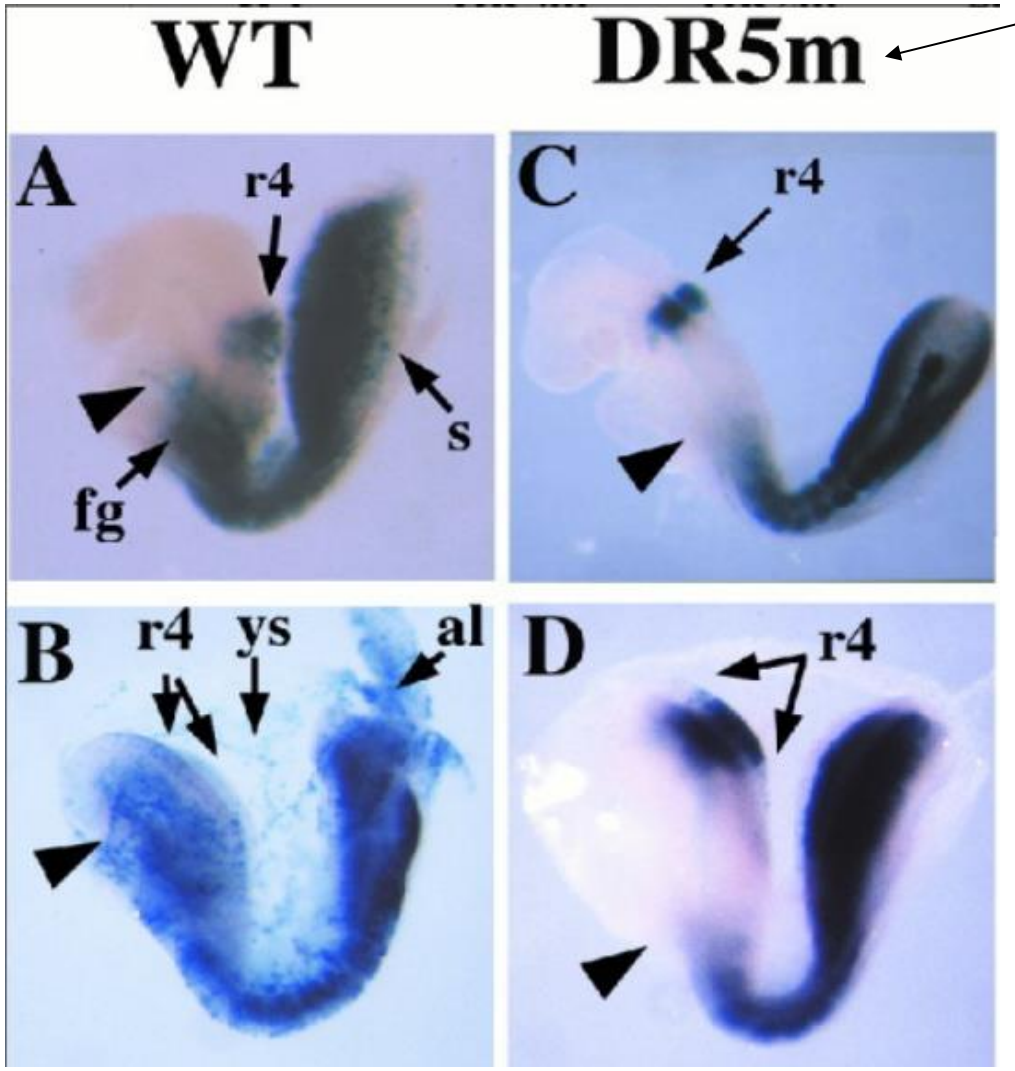
Effet sur l'axe antéro-postérieur de variations de la synthèse et de la dégradation de l'acide rétinoïque



Rétinol = vitamine A = précurseur de l'acide rétinoïque
XRDH10 : enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque
XCYP26A : enzyme impliquée dans la dégradation de l'acide rétinoïque

Development 136, 461-472 (2009) doi:10.1242/dev.024901

Souris transgéniques avec *LacZ* sous le contrôle du promoteur normal (WT) ou muté (DR5m) de *HoxB1*



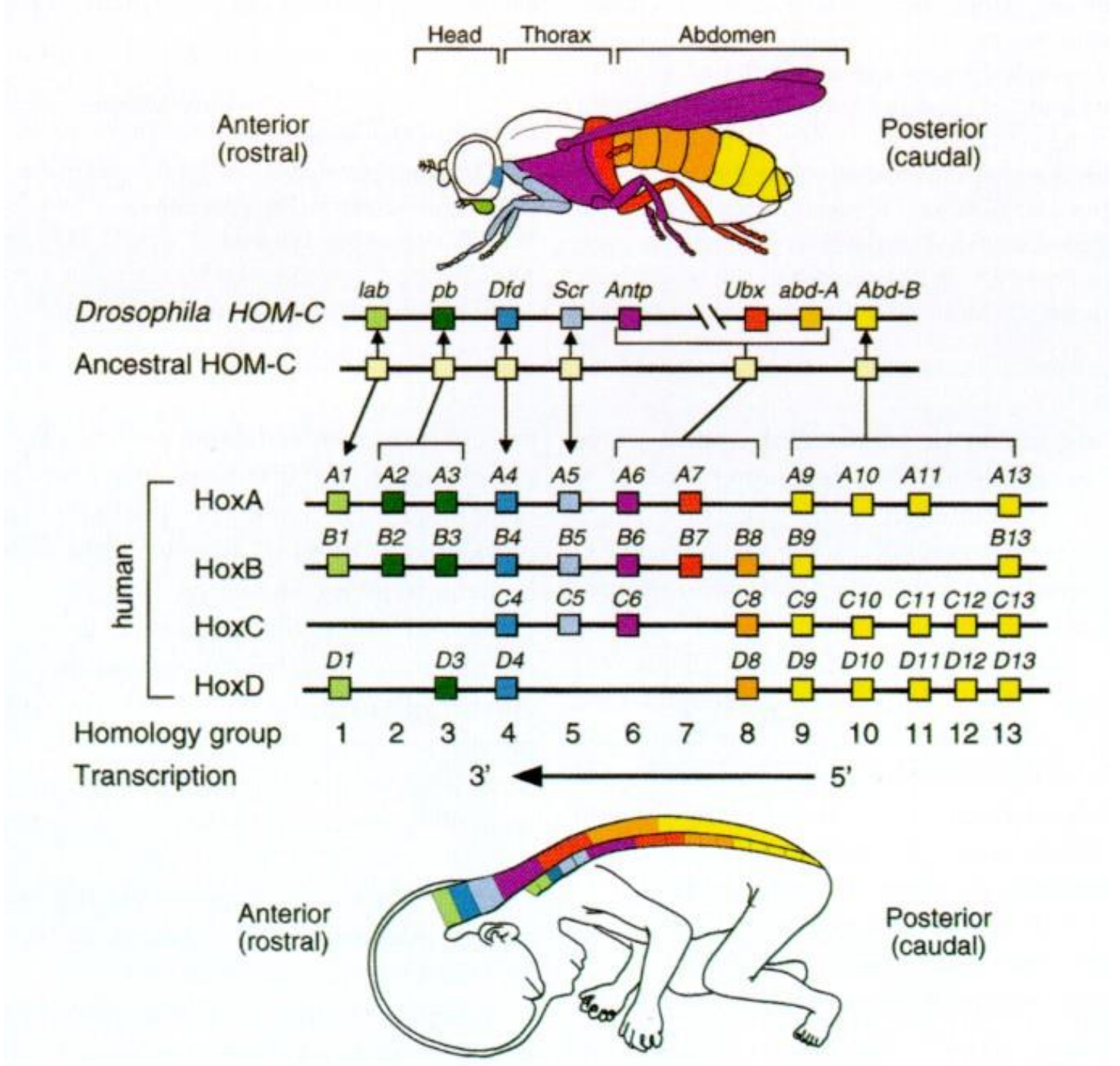
Mutation dans le RARE du promoteur de *HoxB1*

-RA

+RA

r4 = rhombomère 4 = partie du cerveau postérieur qui sert de repère

Les complexes homéotiques



Patron d'expression de quelques gènes *Hox* chez la souris

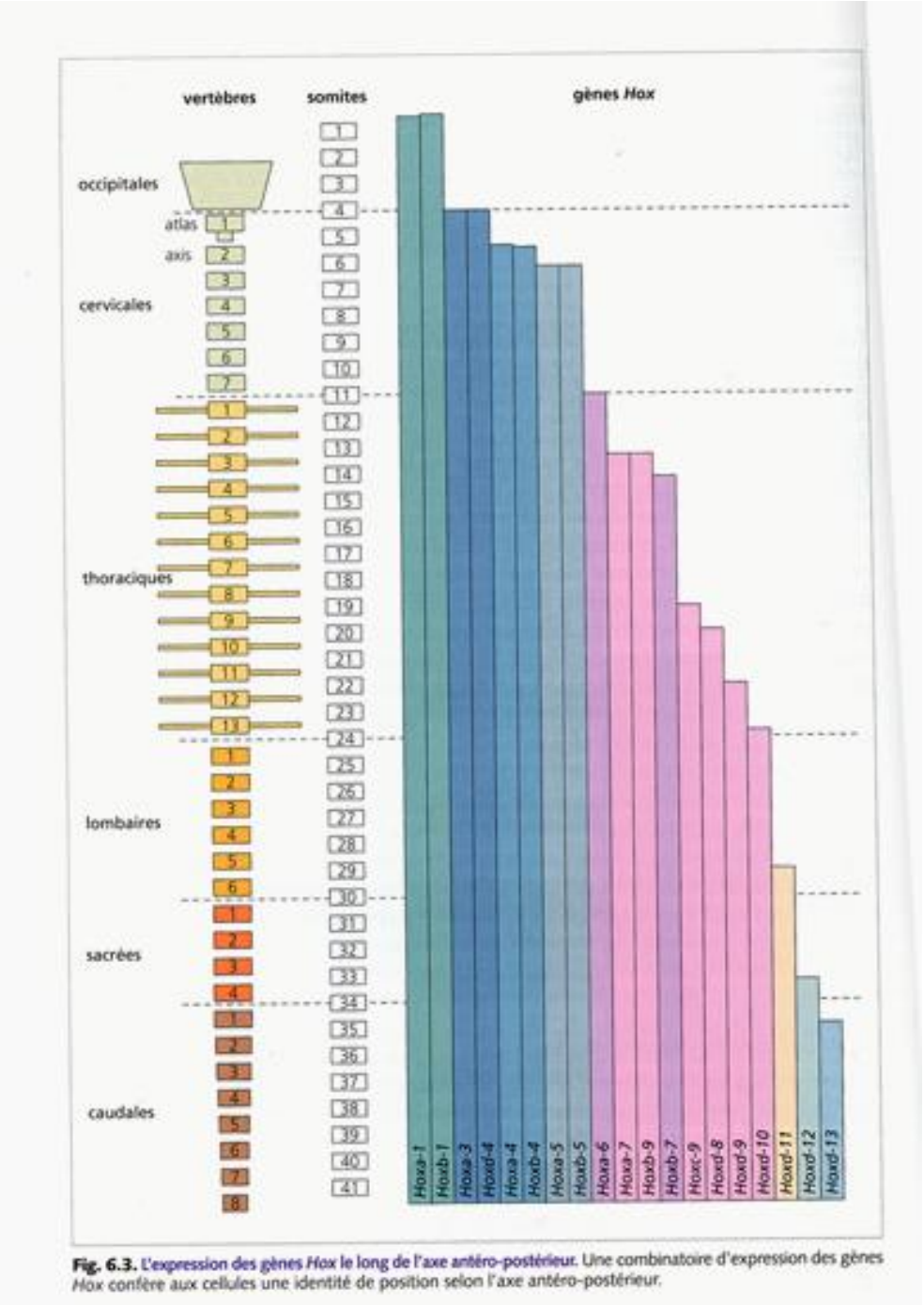


Fig. 6.3. L'expression des gènes *Hox* le long de l'axe antéro-postérieur. Une combinatoire d'expression des gènes *Hox* confère aux cellules une identité de position selon l'axe antéro-postérieur.

Perte d'expression
des gènes *Hox* dans les rhombomères

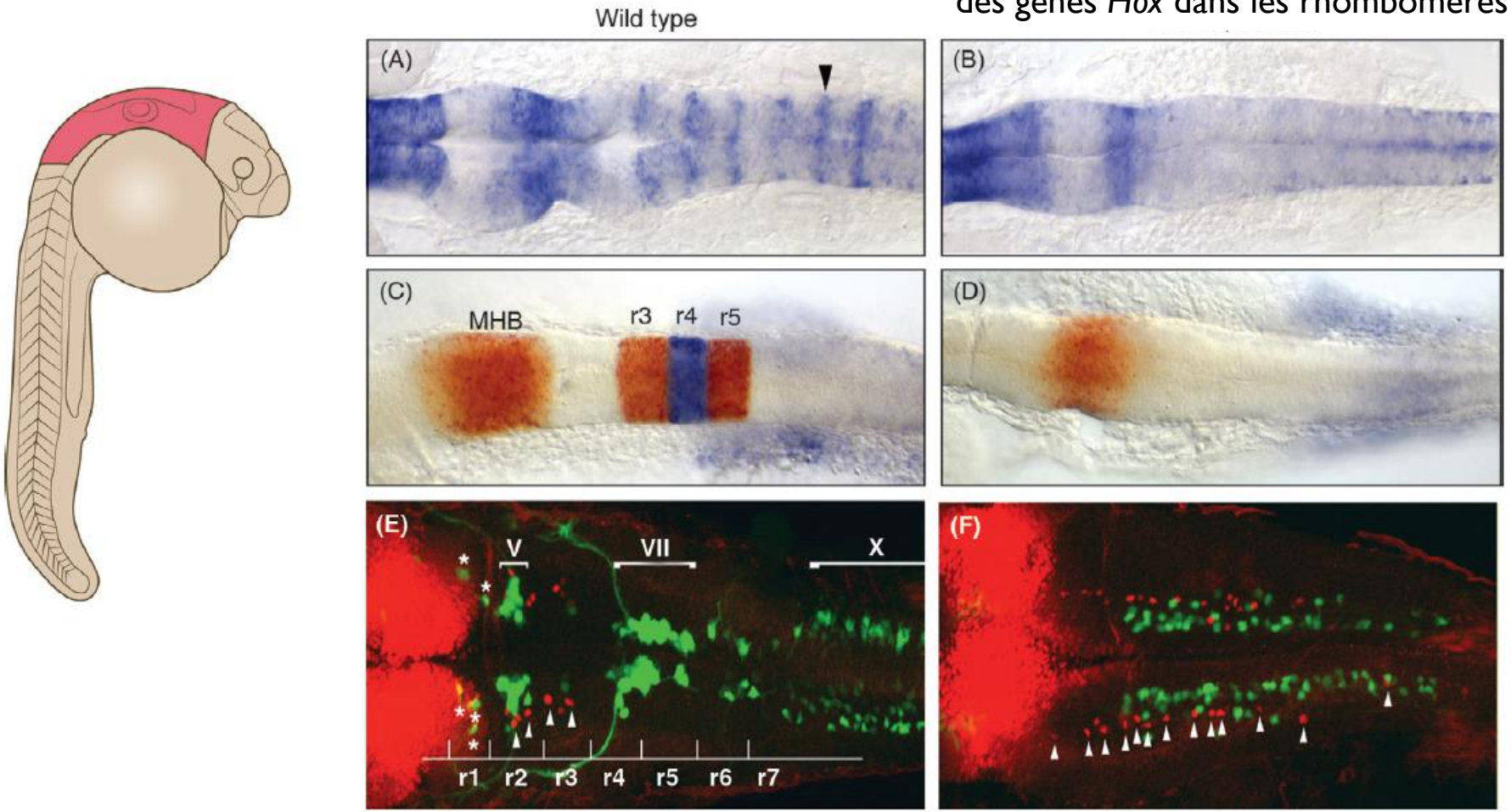
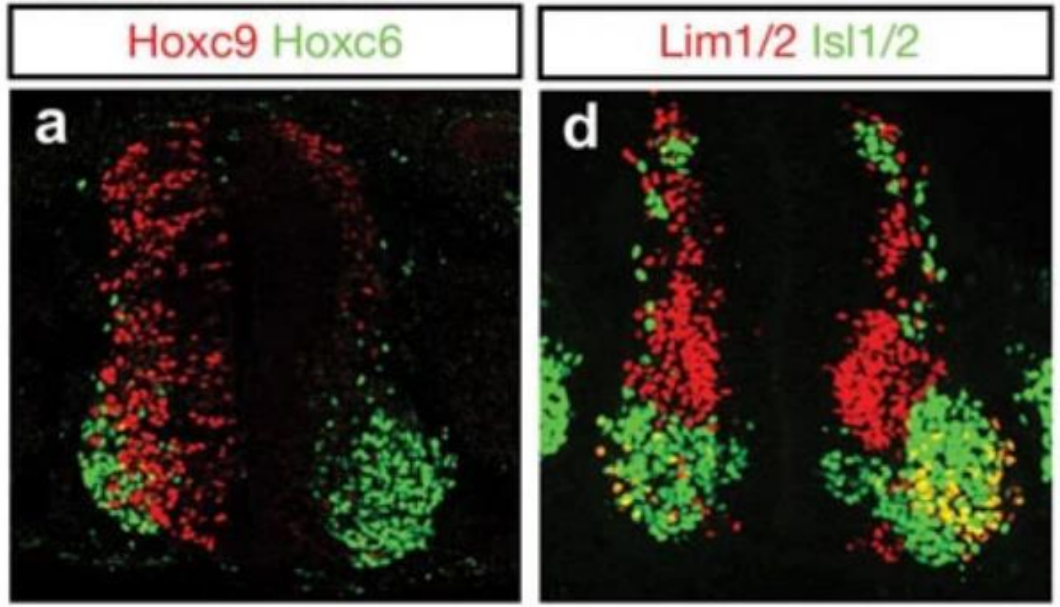


FIG. 2.7 What would the hindbrain look like without *Hox* genes? By eliminating the *pbx* genes from the hindbrain of the zebrafish with a combination of genetic mutation and antisense oligonucleotide gene inactivation, Moens and colleagues found that the "ground state" or default condition of the hindbrain is rhombomere number 1. To the right is a drawing of the fish for orientation, with the hindbrain highlighted in red. A, C, and E show the wild-type embryo, and panels B, D, and F show the mutant embryo hindbrain. In embryos lacking both *pbx* genes all segments are transformed into one long rhombomere 1, and both the specific gene expression seen in rhombomeres 3, 4, and 5 (D) and the diversity of neurons that form in the hindbrain (E) are lost in the mutant. *(Modified from Waskiewicz et al., 2002.)*

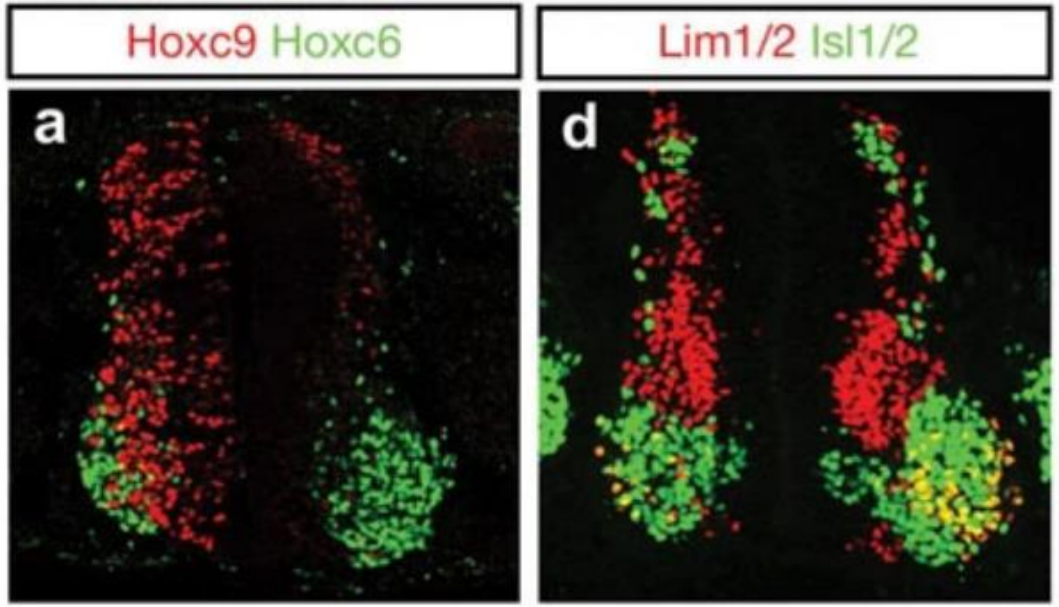
Tubes neuraux d'embryons de poulet électroporés avec
un vecteur permettant l'expression de *Hoxc9*
dans la région brachiale (alors que d'habitude il est exprimé dans la région thoracique)



Hoxc6 = gène *Hox* normalement exprimé dans la région brachiale
Lim+/Isl+ = motoneurones latéraux brachiaux

https://www.nature.com/articles/nature02051

Tubes neuraux d'embryons de poulet électroporés avec
un vecteur permettant l'expression de *Hoxc9*
dans la région brachiale (alors que d'habitude il est exprimé dans la région thoracique)



Hoxc6 = gène *Hox* normalement exprimé dans la région brachiale
Lim+/Isl+ = motoneurones latéraux brachiaux

⇒ Les gènes *Hox* postérieurs inhibent l'expression des gènes *Hox* antérieurs

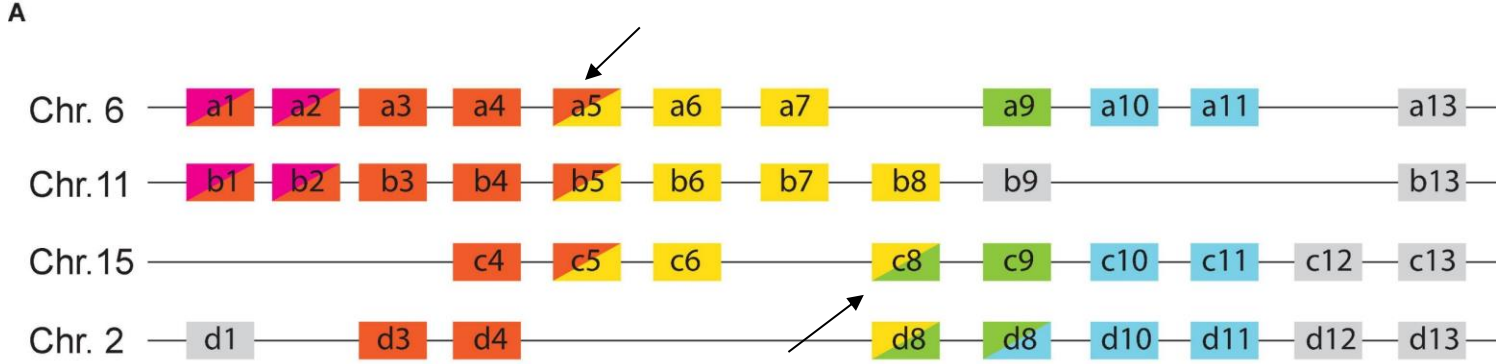
⇒ Le développement des motoneurones brachiaux est perturbé

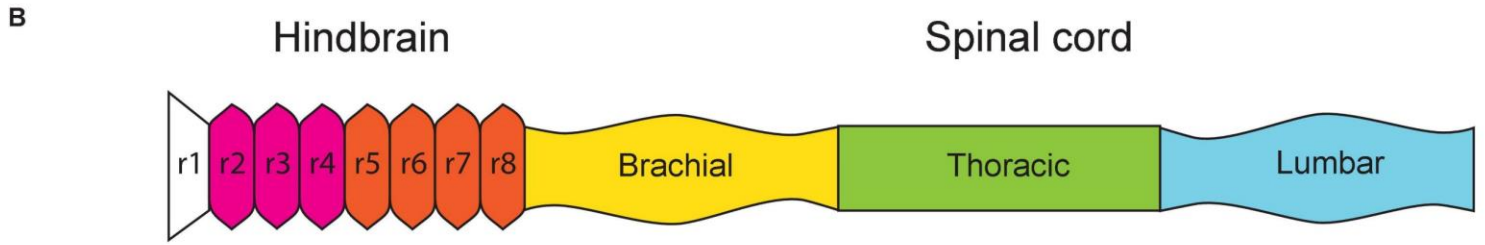
https://www.nature.com/articles/nature02051

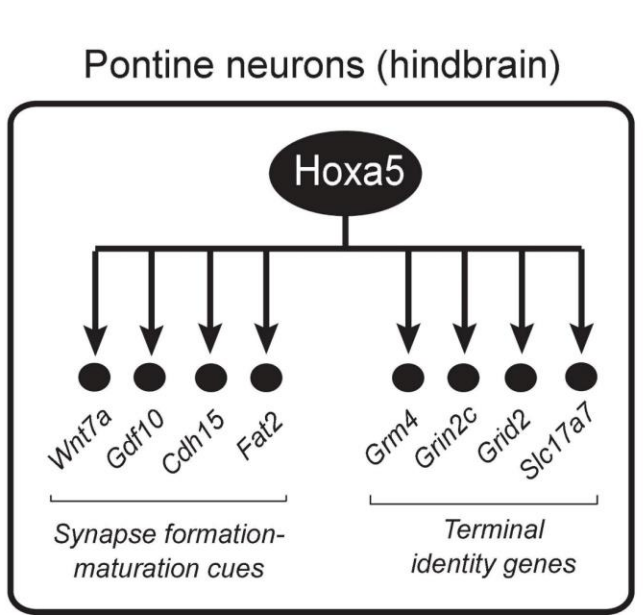
Les gènes-cibles des différents gènes *Hox* selon l'axe A/P ne sont pas les mêmes

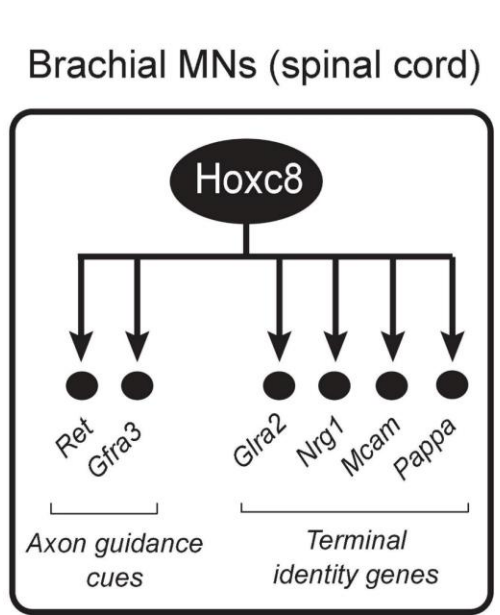
⬇

Les neurones produits ne seront pas les mêmes (identité, connexions...)



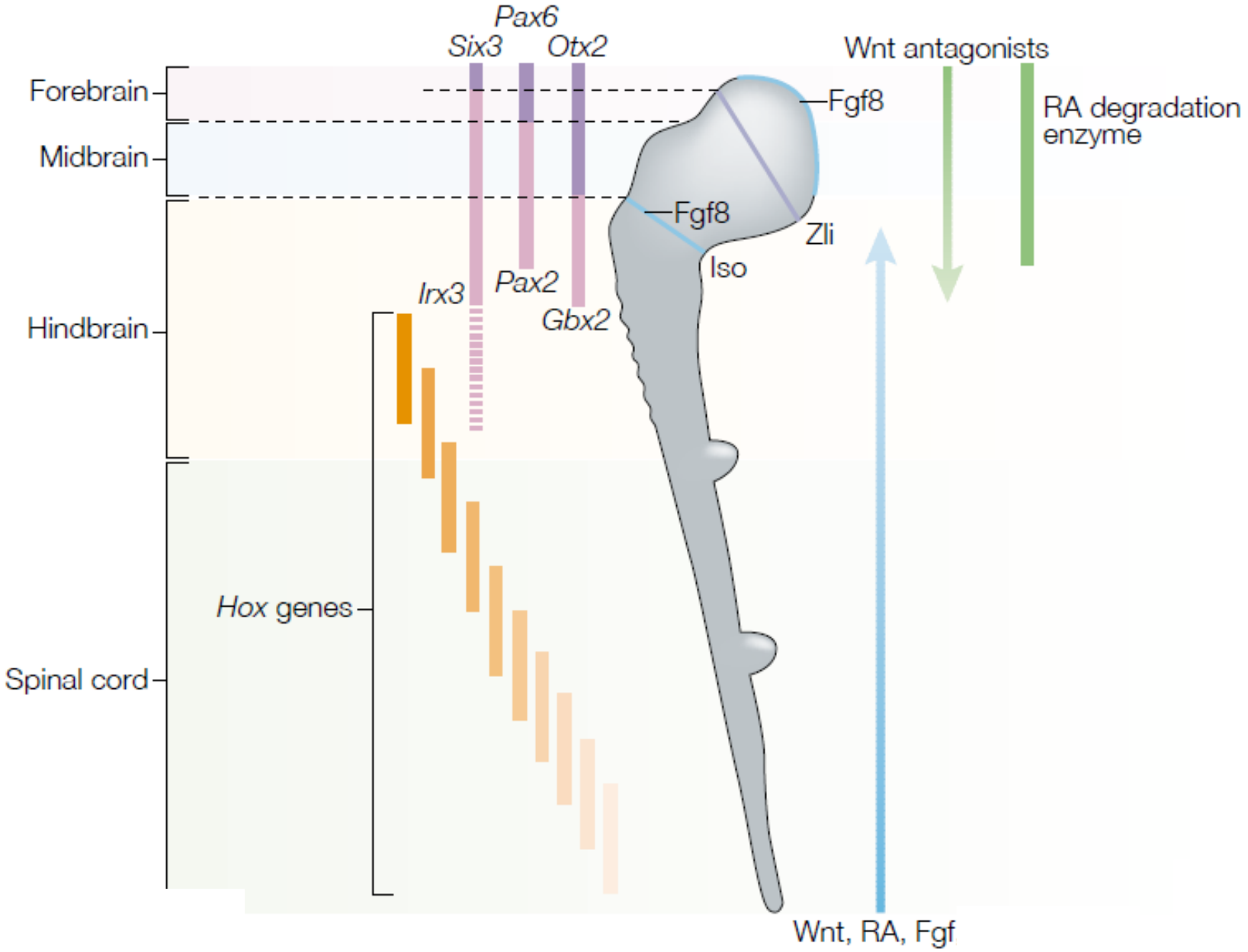






https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2021.801791/full

Bilan :


Pax6
Six3
Otx2
Wnt antagonists
Forebrain
Midbrain
Hindbrain
Spinal cord
Fgf8
RA degradation enzyme
Fgf8
Zli
Iso
Irx3
Pax2
Gbx2
Hox genes
Wnt, RA, Fgf

Partie 4
La régionalisation antéro-postérieure du tube neural

La régionalisation antéro-postérieure (A/P) du système nerveux des vertébrés constitue un processus embryonnaire fondamental permettant la subdivision du tube neural en territoires distincts – encéphale antérieur, moyen, postérieur et moelle épinière (et régionalisation plus fine de chacune de ces structure).

L'induction neurale par l'organisateur de Spemann permet de former un système nerveux antérieur. Les parties plus postérieures du système nerveux sont spécifiées ensuite sous l'influence d'une combinaison de signaux : Wnt, FGF et acide rétinoïque.

Ces voies de signalisation contrôlent l'expression de facteurs de transcription dont l'expression détermine l'identité régionale du système nerveux selon l'axe A/P

Les plus importants de ces facteurs de transcription sont codés par les gènes *Hox* qui forment 4 complexes chez les Vertébrés et dont l'expression dépend de leur position dans le génome (règle de colinéarité).