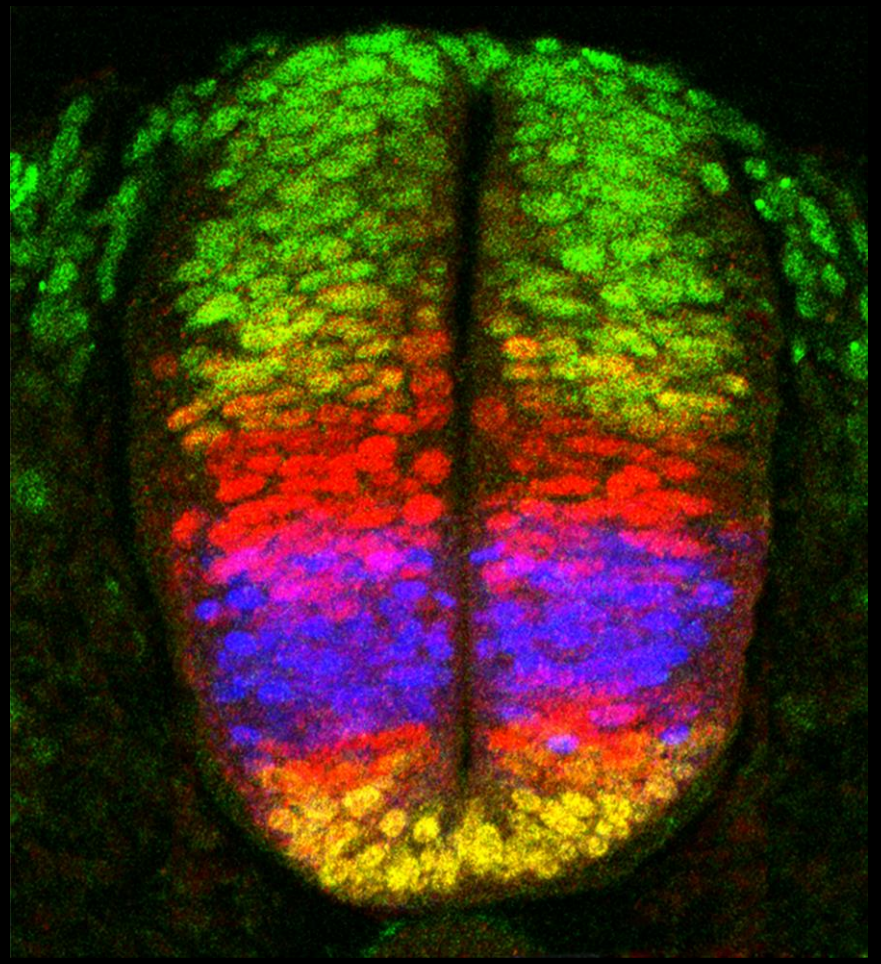
Signalisations au cours du développement des Vertébrés 3

Patrick PLA
Université Paris Saclay

https://bcgdevelop.fr/



Partie 5
Régionalisation selon les axes proximo-distal et antéro-postérieur du bourgeon de membre

Un rassemblement de cellules d'origines variées

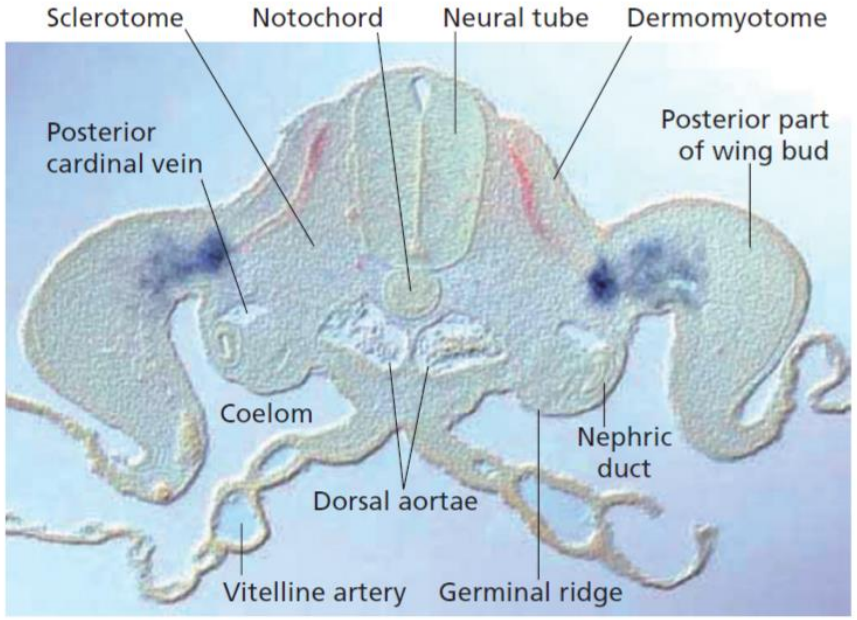
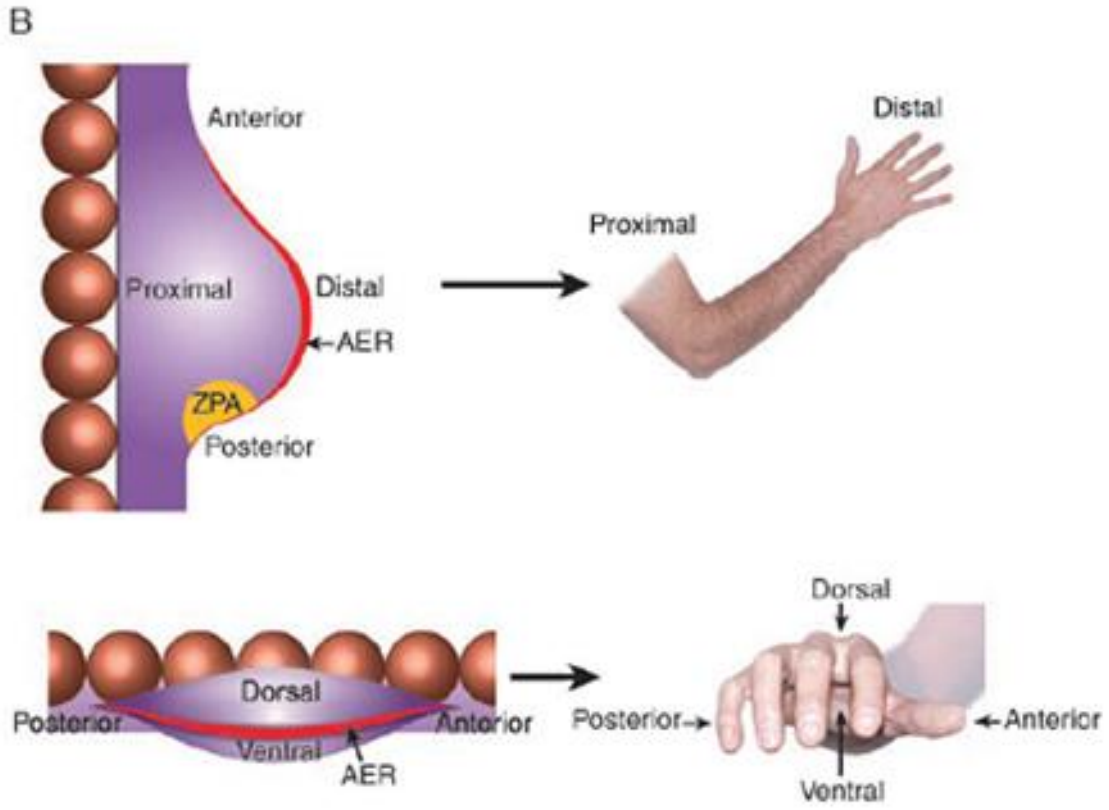
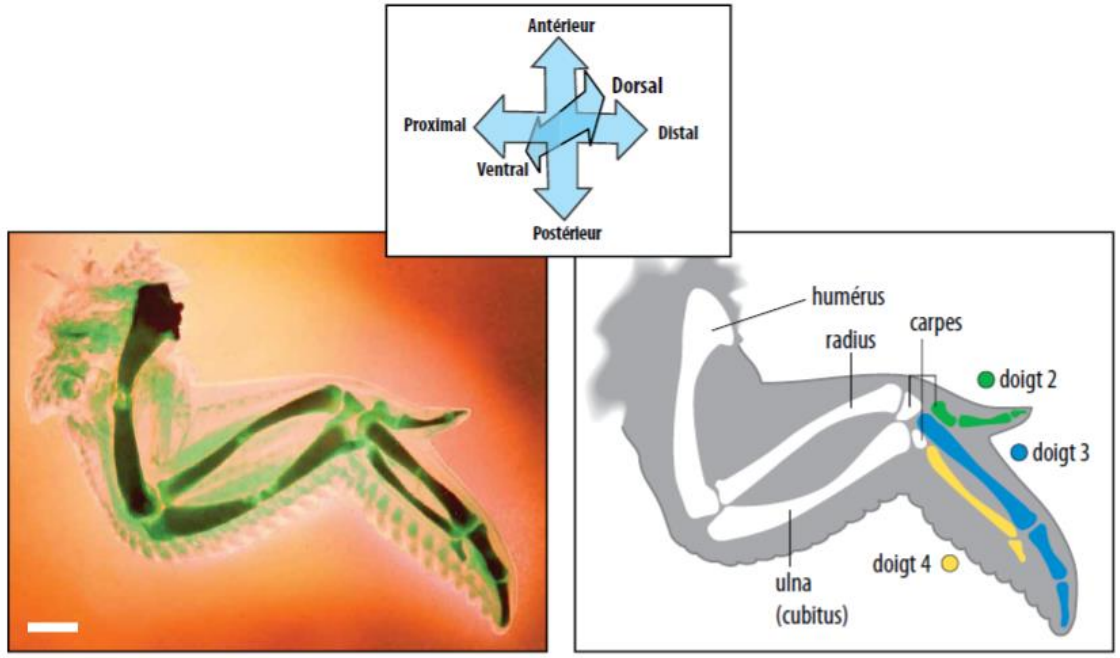


Fig. 9.19 Transverse section through trunk region of 3-day chick embryo. The blue color is the product of *in situ* hybridization for mRNA of the transcription factor *LBX1*, and indicates myoblasts migrating into the limb buds. Reproduced from Bryson-Richardson and Currie. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 632–646, with permission from Nature Publishing Group.

- Ectoderme non neural → Epiderme
- Crêtes neurales → Mélanocytes, Récepteurs sensoriels
- Tube neural → Motoneurones
- Somites
  - Dermatome → Derme
  - Myotome → Muscles striés
- Lames latérales
  - Somatopleure → Os, tendons
  - Splanchnopleure → Vaisseaux sanguins

Une structure en 3D





Croissance du bourgeon de membre selon l'axe proximo-distal

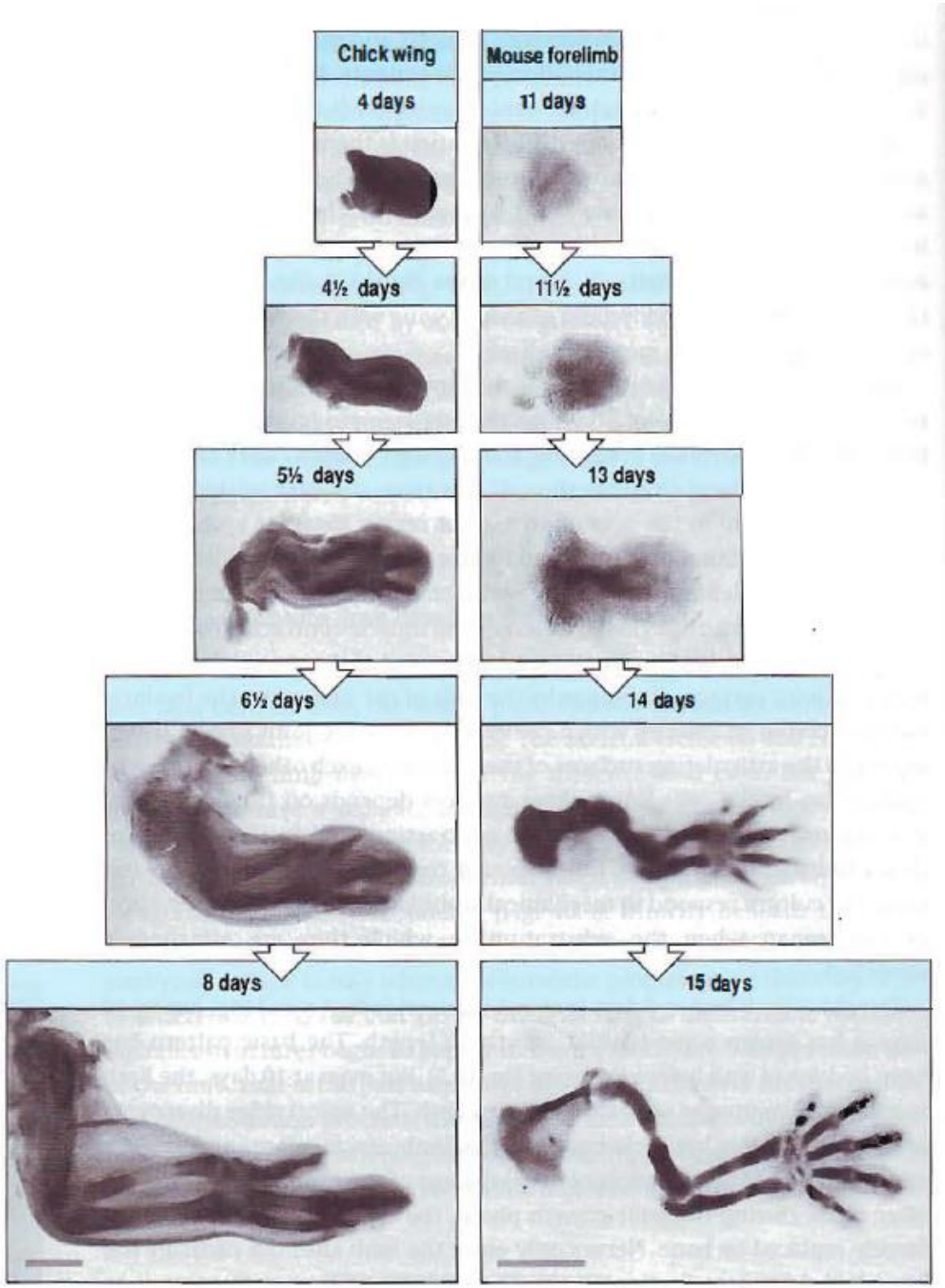
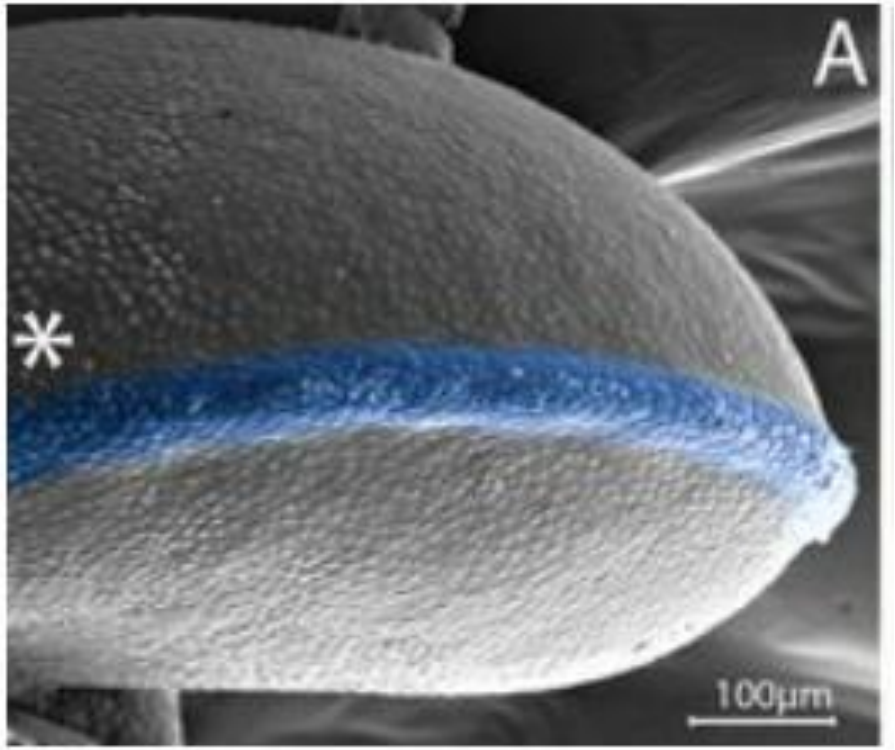
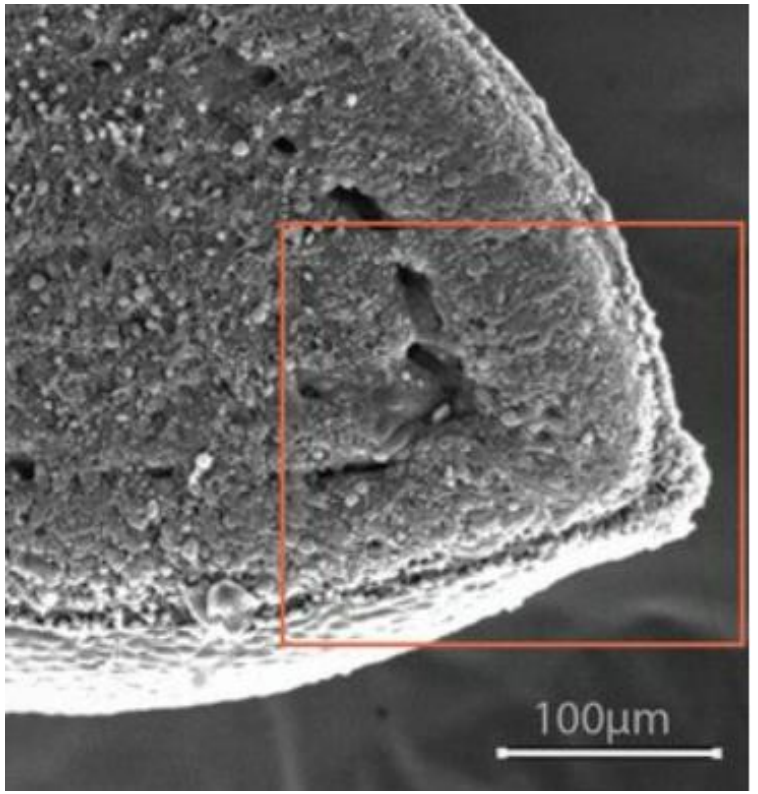


Fig. 10.5 The development of the chick wing and mouse forelimb are similar. The skeletal elements are laid down, as cartilage, in a proximo-distal sequence as the limb bud grows outward. The cartilage of the humerus is laid down first, followed by the radius and ulna, wrist elements, and digits. Scale bar = 1 mm.

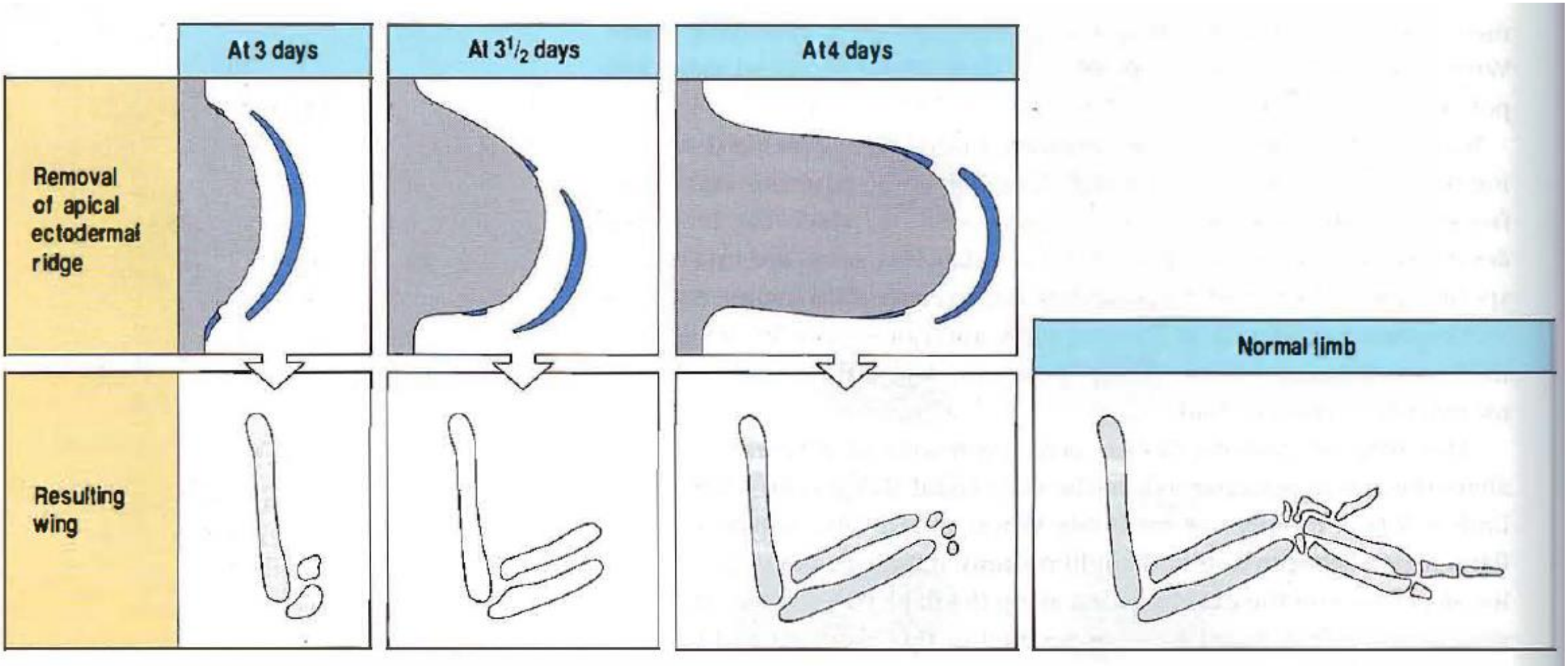
Un épiderme épaissi à l'extrémité distale du bourgeon de membre : l'AER (Apical Ectodermal Ridge = crête apicale ectodermique)





https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2019.00977/full

Ablation de l'AER à différents moments du développement



Action de l'acide rétinoïque sur la régénération chez la salamandre

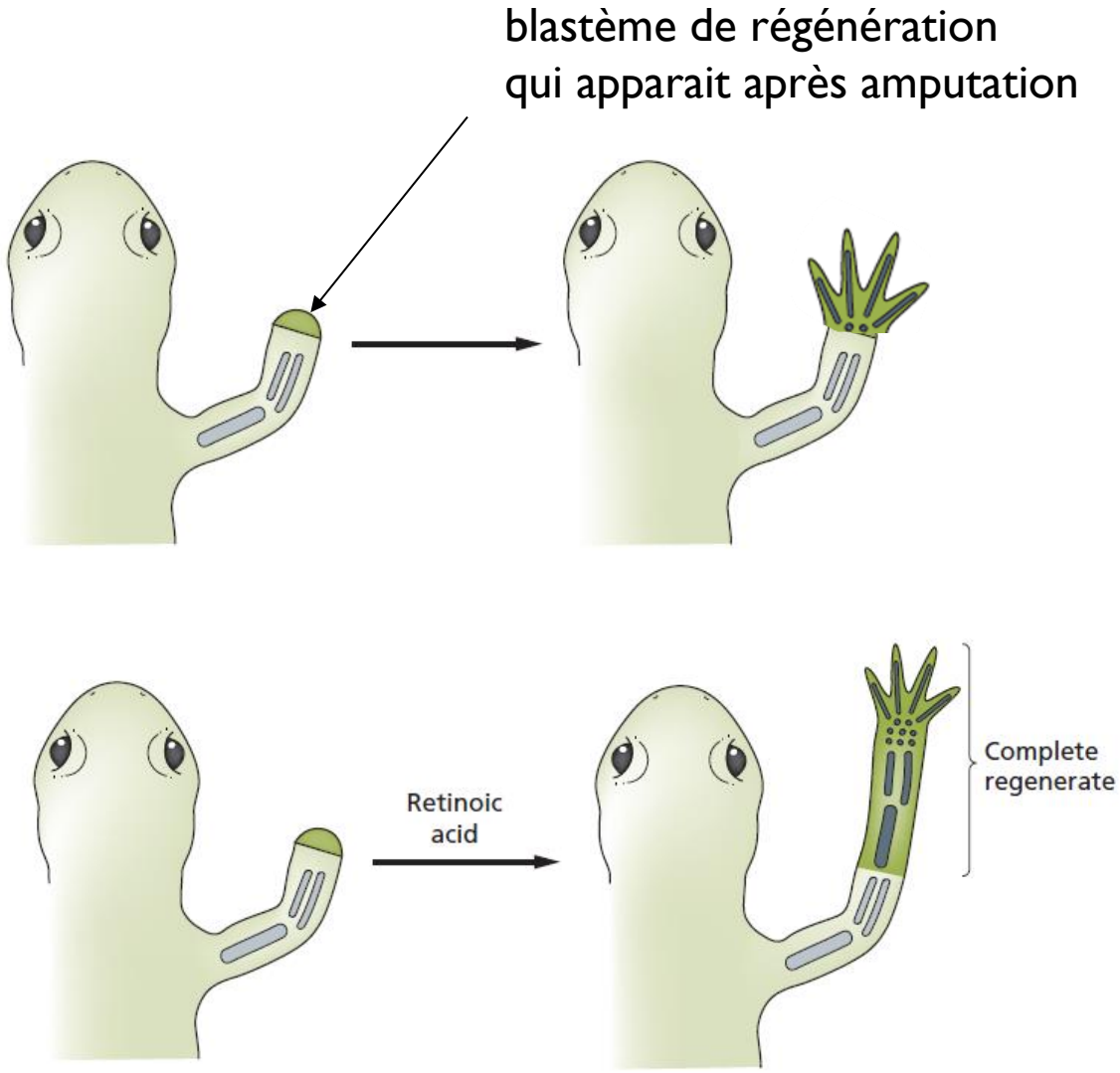
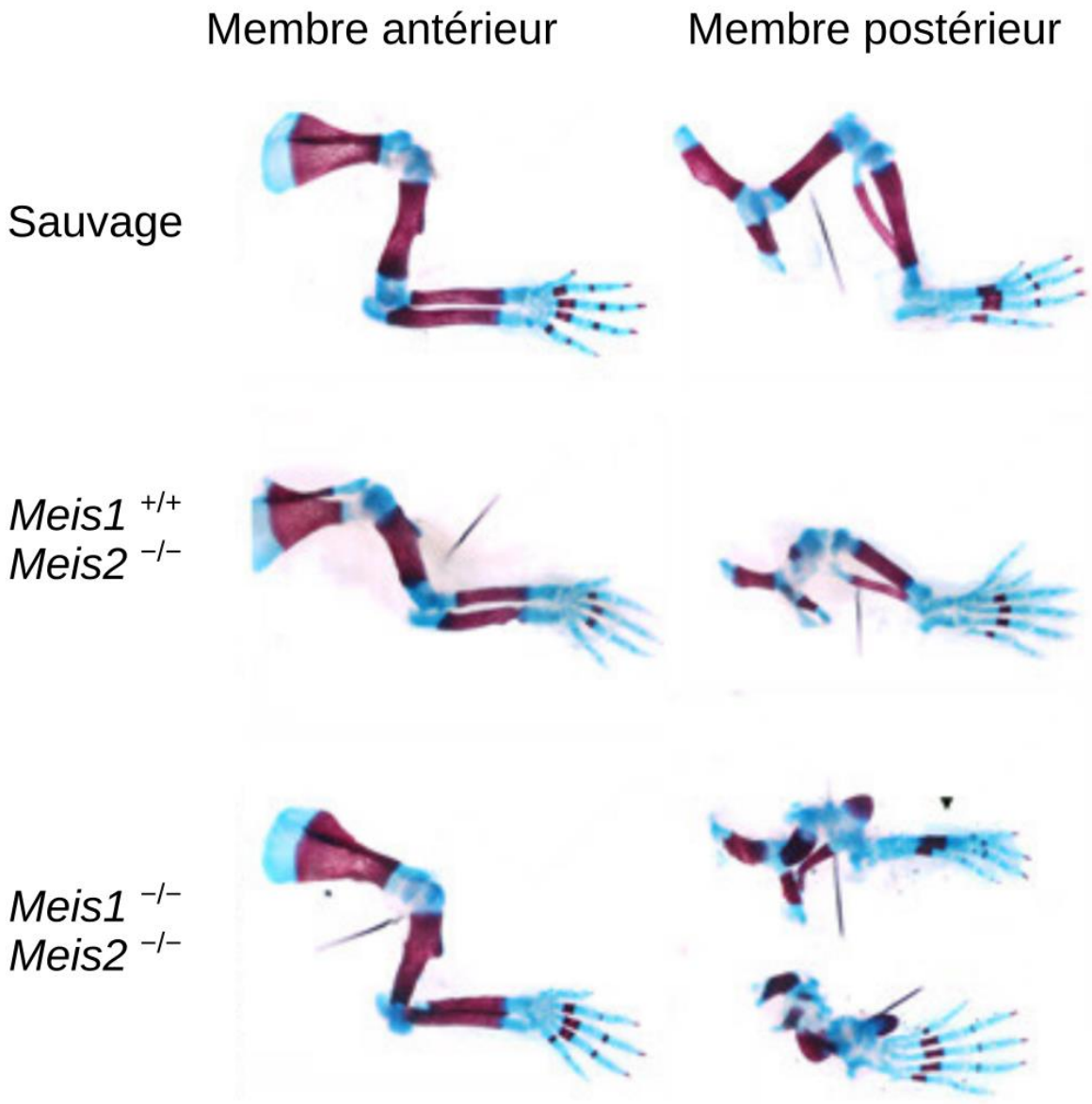


Fig. 20.19 Proximalization of blastema by retinoic

Slack, *Essential Developmental Biology*

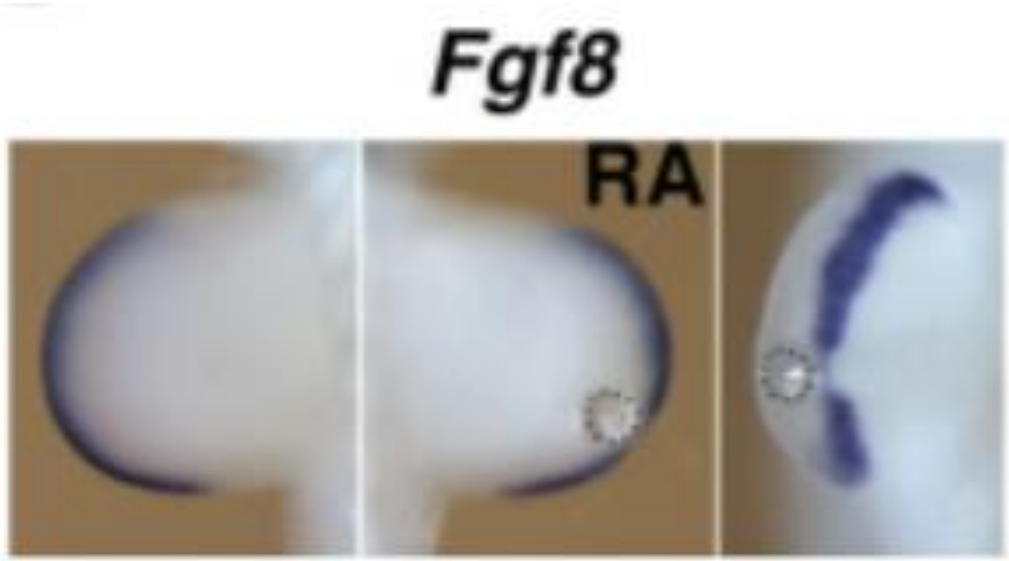


Meis1 et *Meis2* sont nécessaires au développement des structures proximales du bourgeon de membre

Préparations squelettiques d'embryons sauvages de souris et de mutants *Meis* colorés au bleu alcian, qui colore les cartilages, et au rouge alizarine, qui colore les os, à 18,5 jours de développement. Les mutants sont des embryons porteurs du système de délétion conditionnelle Cre/Lox, qui permet de restreindre l'inactivation des gènes *Meis* au membre postérieur. Le membre antérieur, non affecté, sert de témoin. Dans les résultats présentés, le premier mutant possède une copie fonctionnelle de *Meis1*, mais n'exprime plus *Meis2*. Le second mutant n'exprime plus ni *Meis1*, ni *Meis2*.

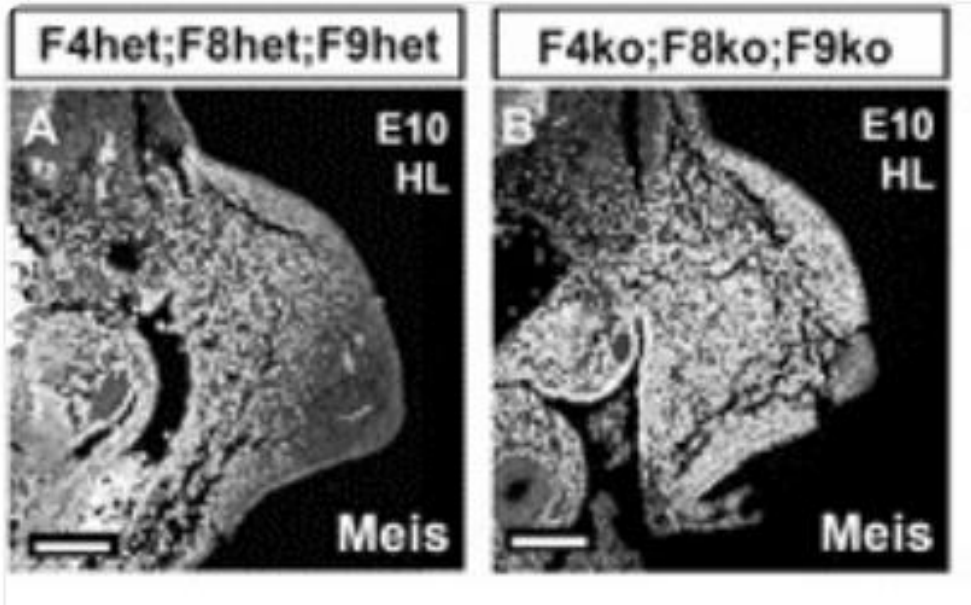
Auteurs : Delgado et coll., 2020

Expression de *Fgf8* dans l'AER et effet de l'acide rétinoïque



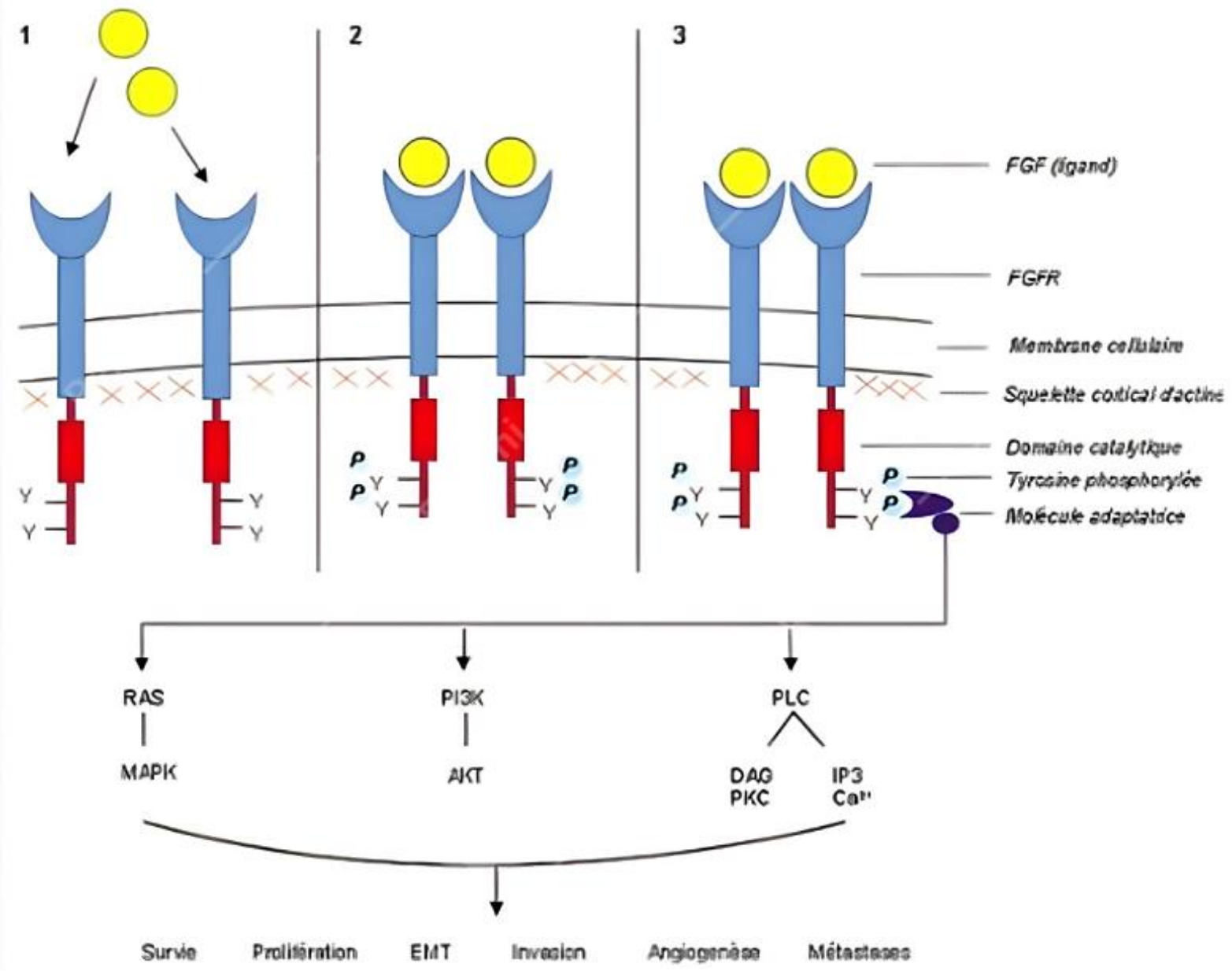
https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3082298/

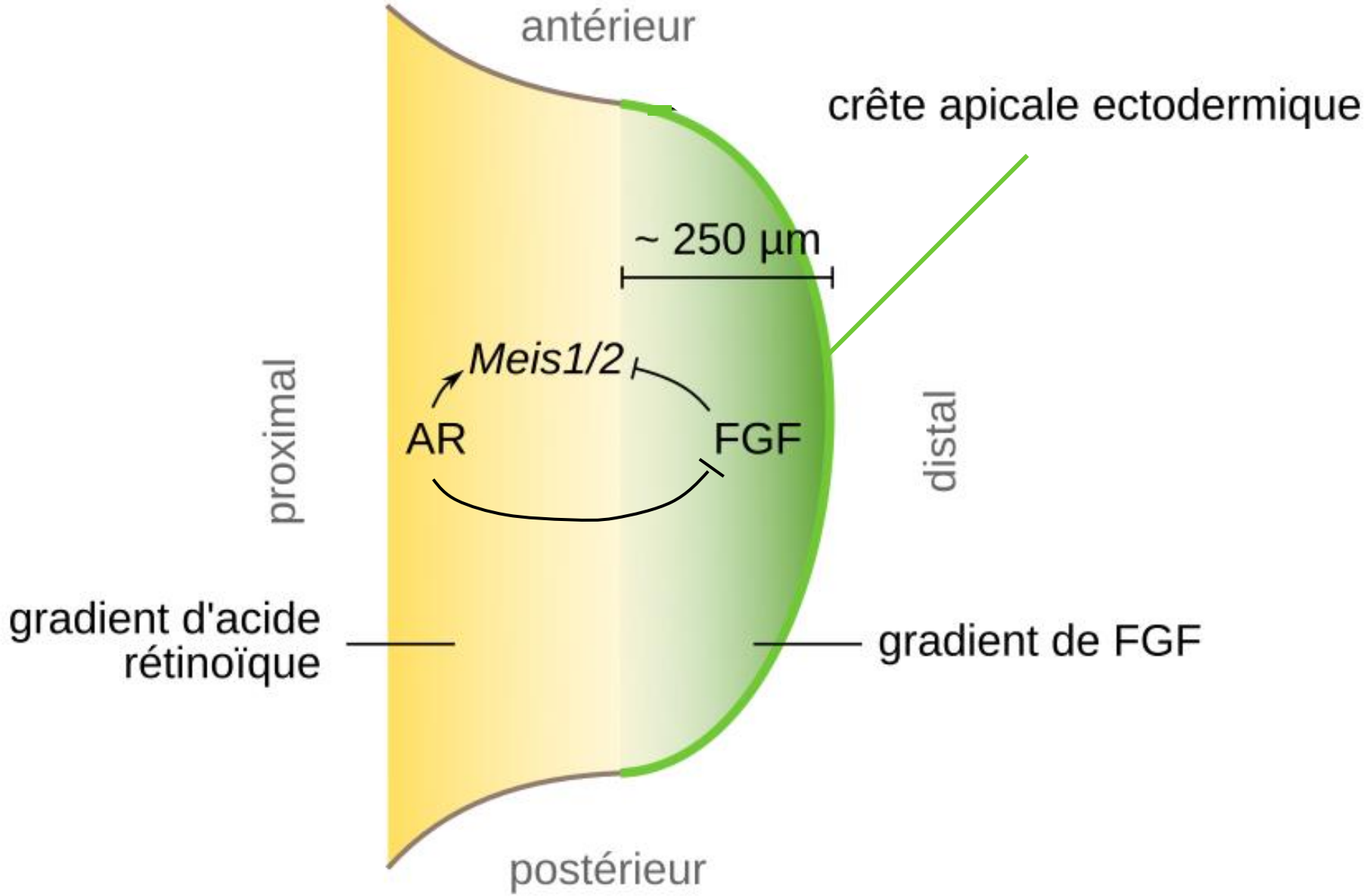
Expression des gènes *Meis* quand l'AER n'exprime plus de FGF



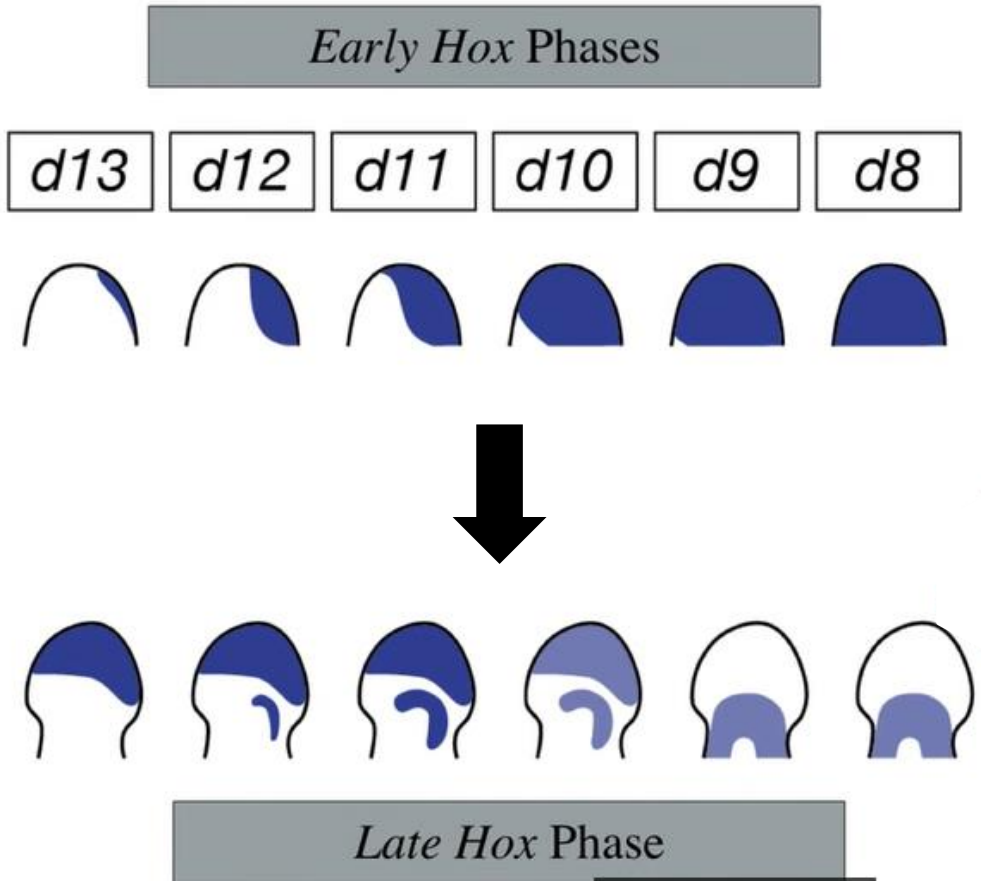
Hybridation *in situ*
avec une sonde radioactive
(ne s'utilise plus à
notre époque !)

Voies de signalisation activées par les FGF



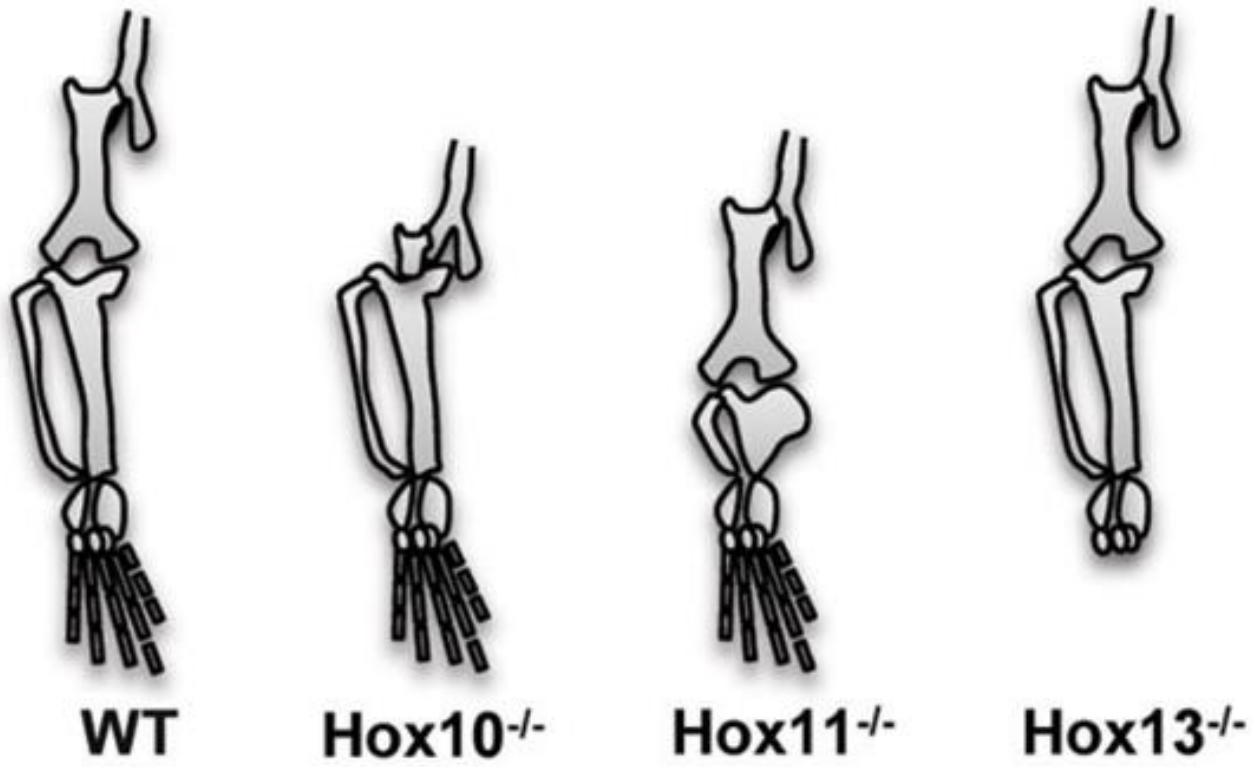

antérieur
crête apicale ectodermique
~ 250 µm
Meis1/2
AR
FGF
proximal
distal
gradient d'acide rétinoïque
gradient de FGF
postérieur

Le patron d'expression des gènes *Hox* présente 2 phases dans le bourgeon de membre



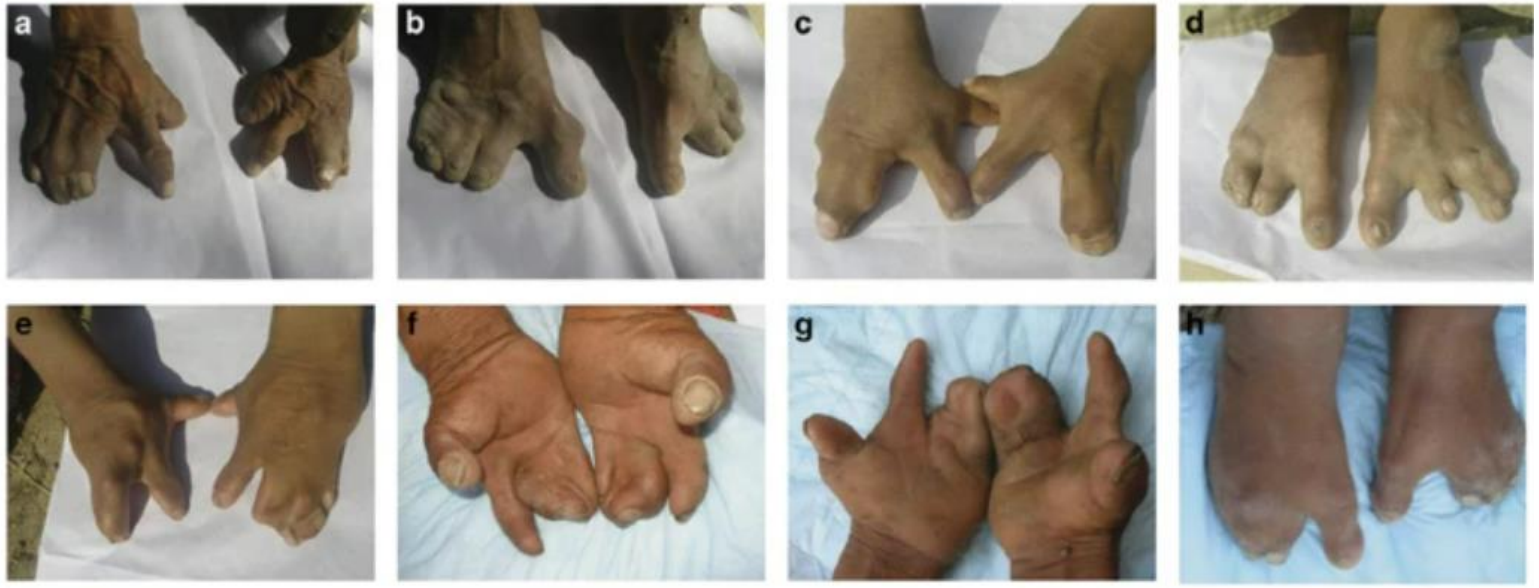
https://www.youtube.com/watch?v=MorhQ5uSug4

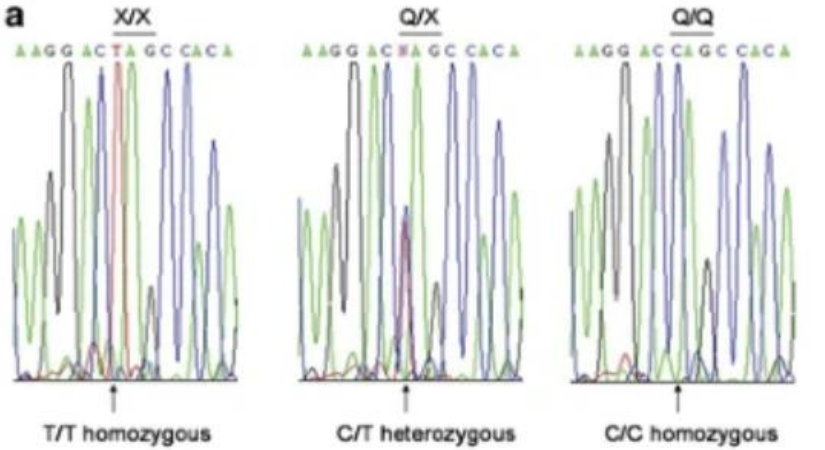
Effet des mutations des groupes paralogues de gènes *Hox* sur le membre chiridien



Lorsqu'on réalise l'invalidation des gènes *Hox* du groupe de paralogie 10 chez la souris, le stylopode est très réduit. C'est le zeugopode qui est réduit après invalidation des gènes *Hox* du groupe de paralogie 11. Les doigts à l'extrémité de l'autopode ne se développent pas après invalidation des gènes *Hox* du groupe de paralogie 13.

Exemple d'une famille avec une synpolydactylie causée par la présence d'un ou deux allèles mutants non-sens de *HOXD13*



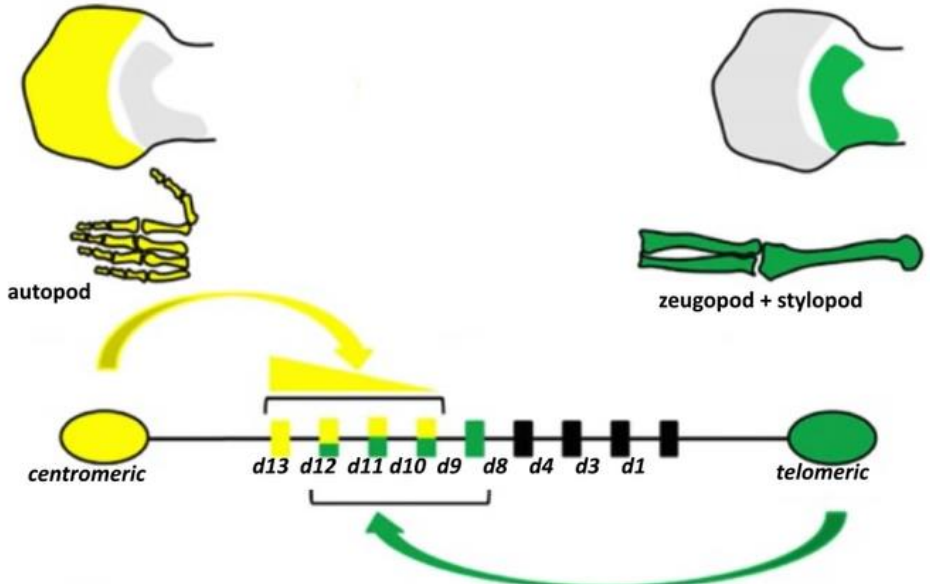


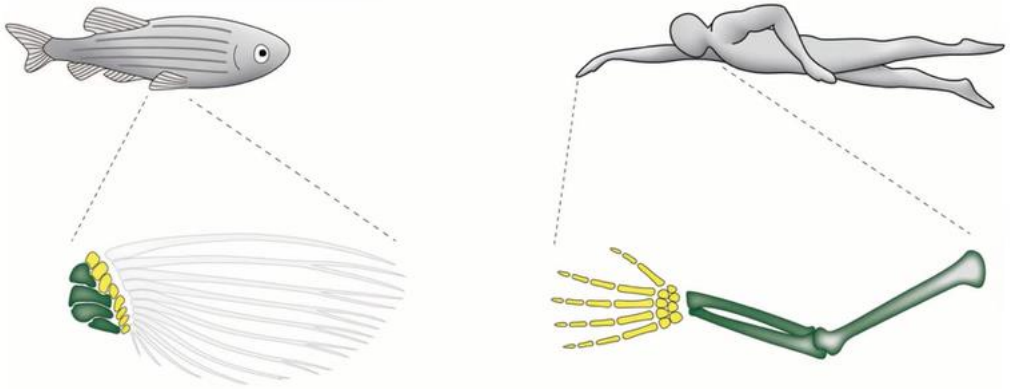
code STOP
(sur 1 ou 2 allèles)
↓
HOXD13 tronqué
↓
synpolydactylie

codon
code glutamine
↓
HOXD13 normal
↓
doigts
normaux

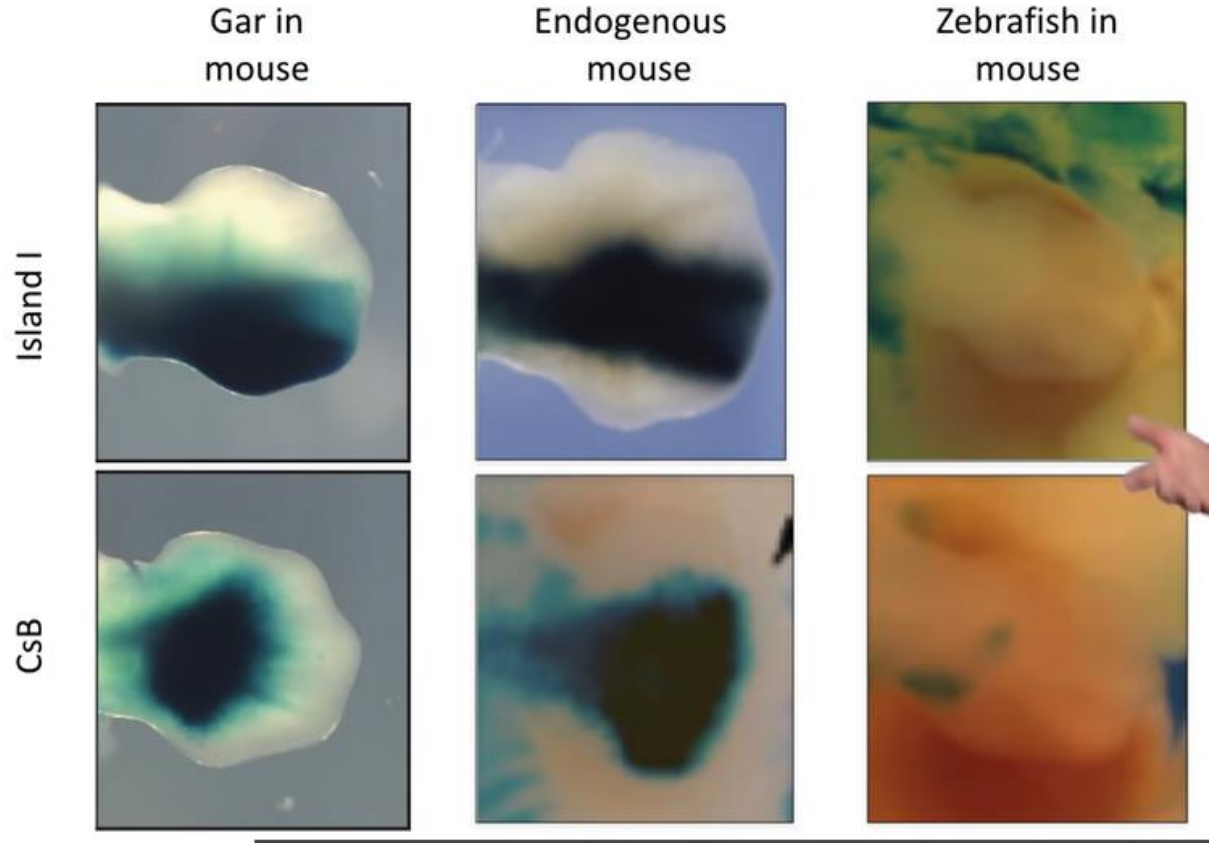
https://www.nature.com/articles/jhg201184

Les séquences régulatrices des gènes *Hox* sont en grande partie conservées chez les Vertébrés





Lépisostéidé



Gène rapporteur *LacZ* sous le contrôle des séquences régulatrices

https://www.youtube.com/watch?v=MorhQ5uSug4

La ZPA et l'axe antéro-postérieur du bourgeon de membre

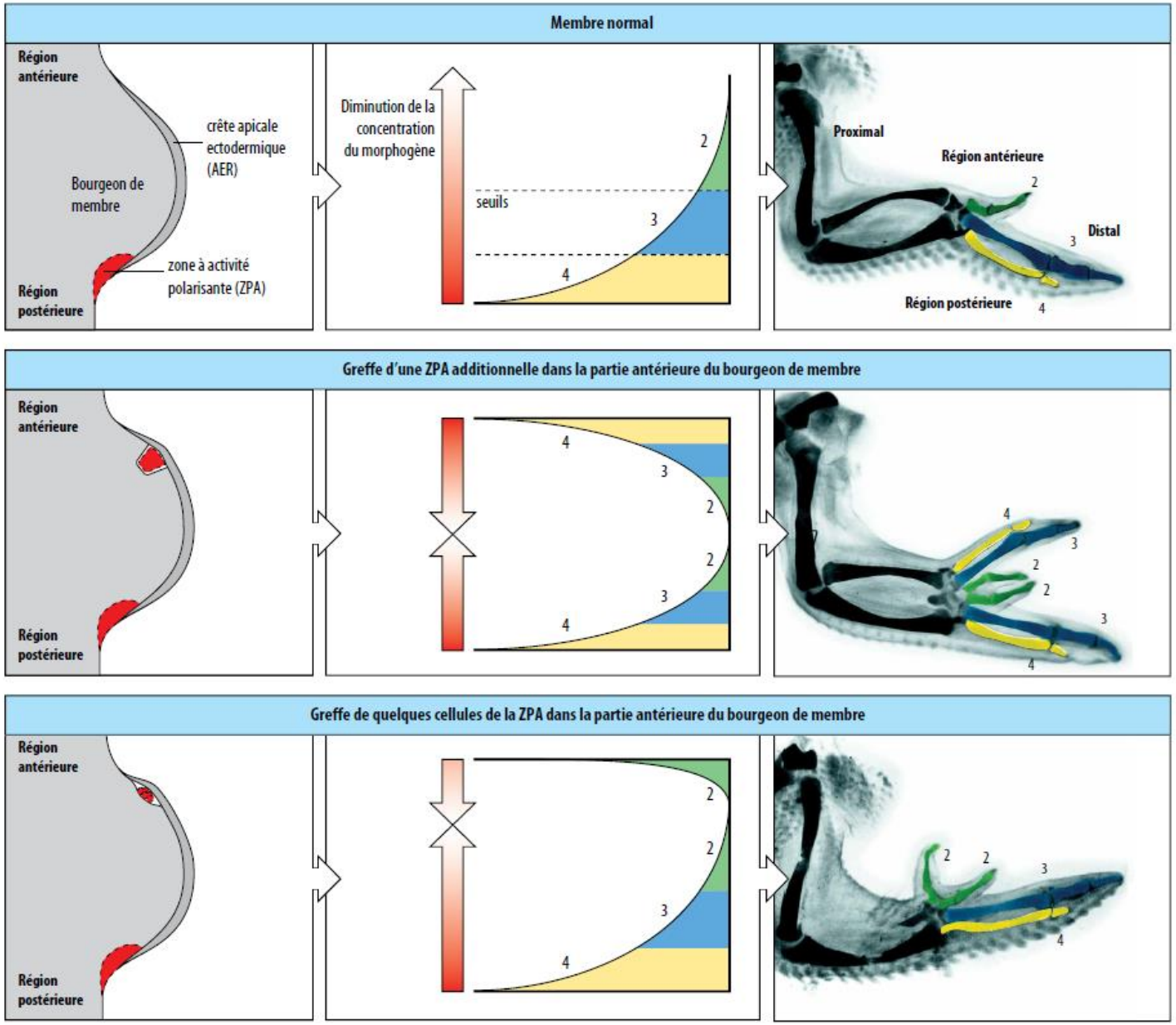
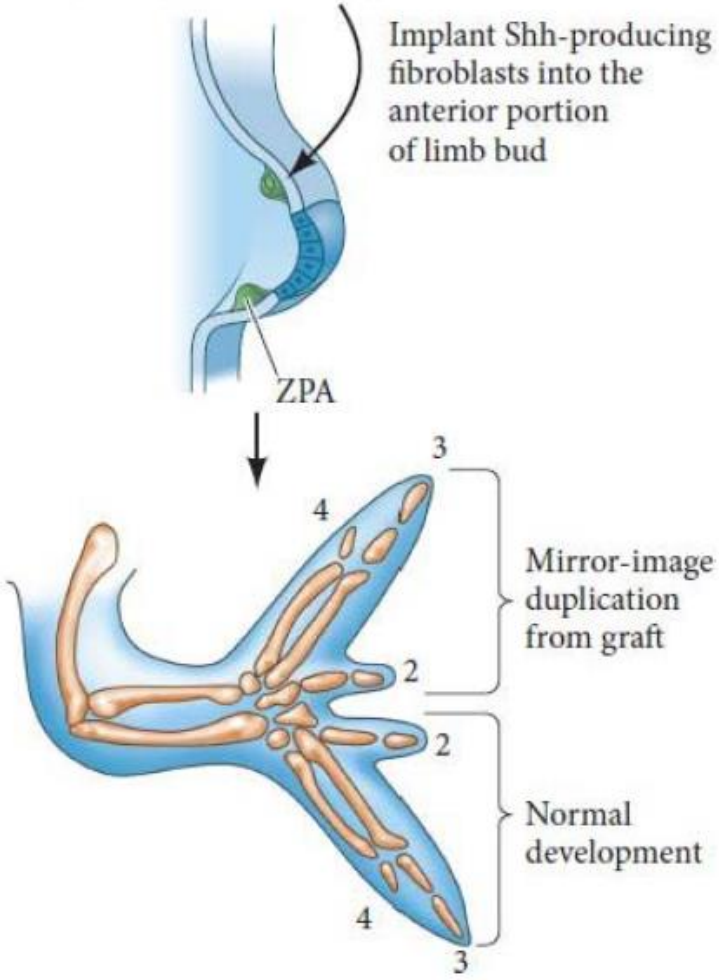


Fig. 11.14 La zone à activité polarisante (ZPA) peut spécifier des informations positionnelles le long de l'axe antéro-postérieur. Si la ZPA est la source d'un gradient de concentration d'un morphogène, les différents doigts pourraient être spécifiés à différents seuils de concentration du signal, comme cela est montré pour une aile normale de poulet dans les illustrations du haut, dans laquelle le doigt 4 se forme là où la concentration est la plus élevée et le doigt 2 là où elle est faible. Les seuils de concentration du morphogène qui spécifient les différents doigts sont représentés dans la colonne centrale, et les doigts formés révélés dans les photographies à droite avec des rappels de couleur. La greffe d'une zone à activité polarisante additionnelle dans la région antérieure du bourgeon d'aile (illustrations au centre) conduirait à une duplication en miroir du gradient de signal et donc à la duplication observée des doigts. La greffe d'un petit nombre de cellules de la ZPA dans la région antérieure du bourgeon ne produit qu'un faible signal et seul un doigt 2 additionnel se forme (illustrations du bas).

(A)

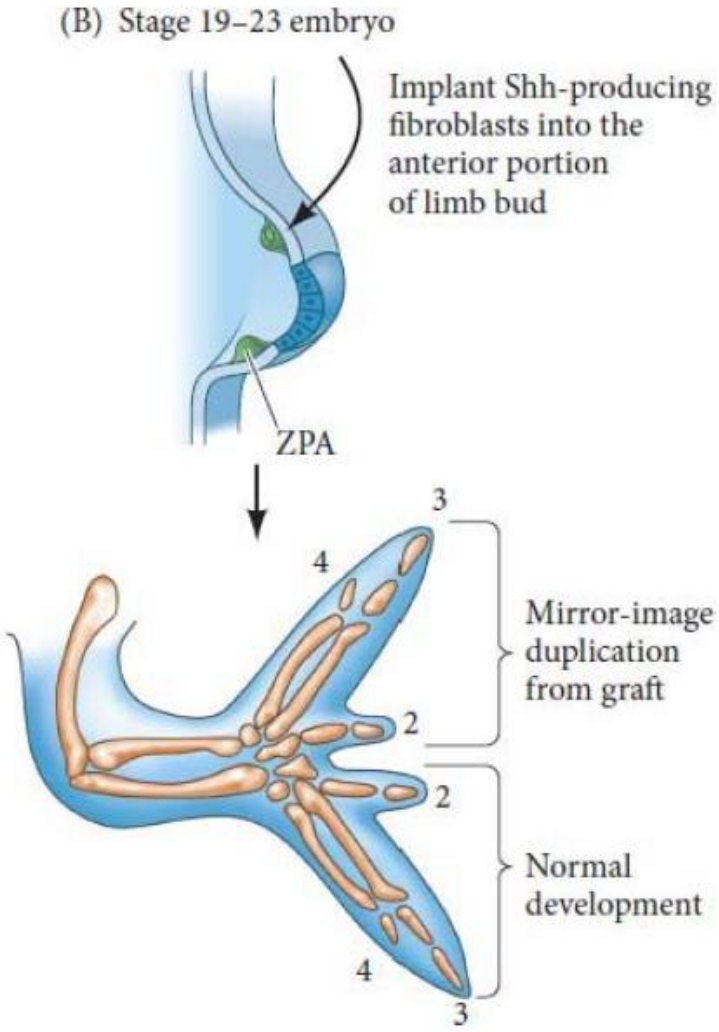
Hybridation
in situ
Shh

(B) Stage 19–23 embryo

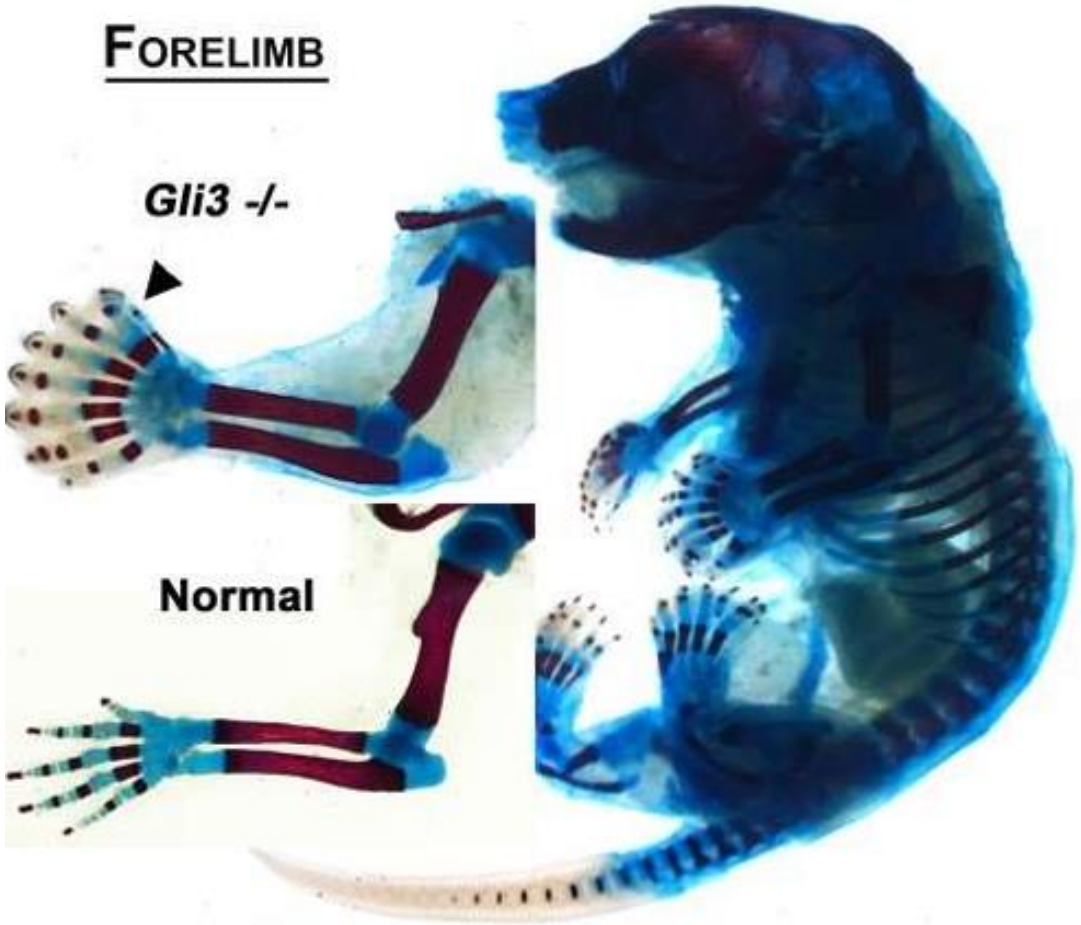


Shh est exprimé dans la ZPA et est suffisant pour la remplacer dans les greffes

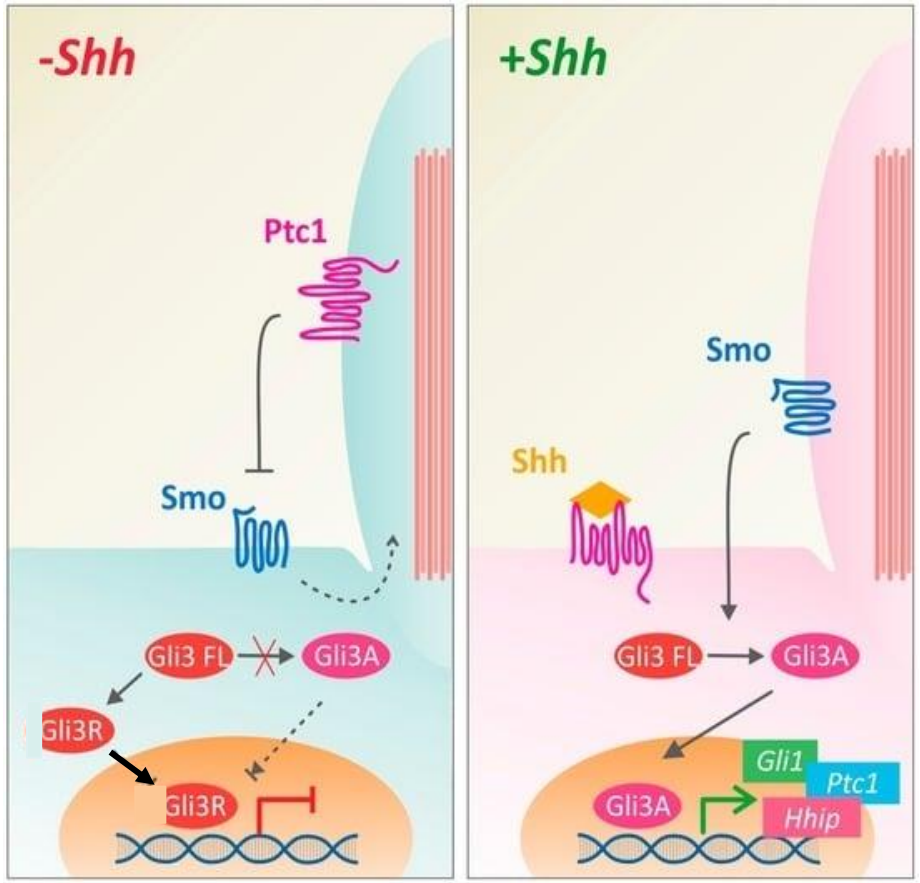
Hybridation
in situ
Shh



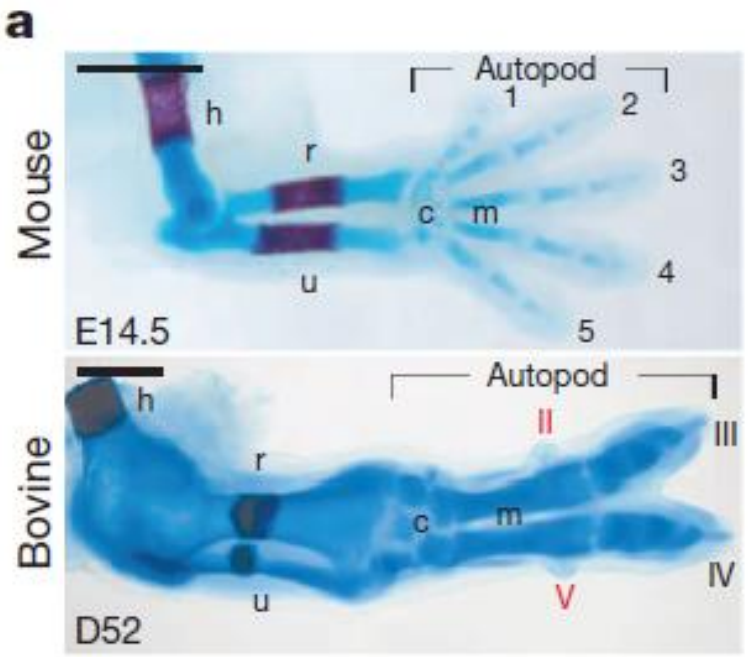
Effet du KO de *Gli3* sur le développement des membres

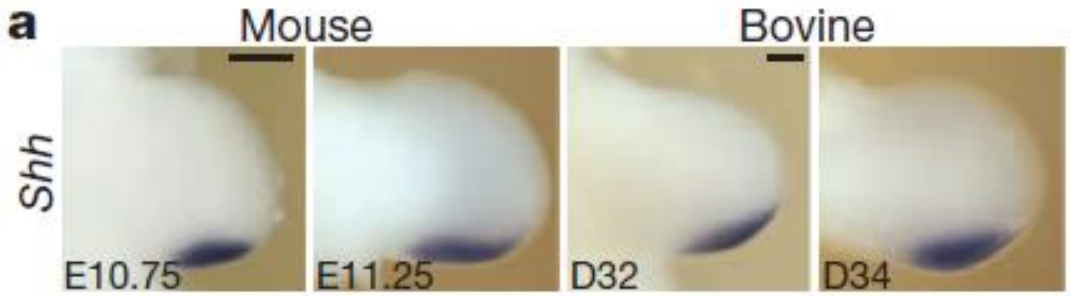


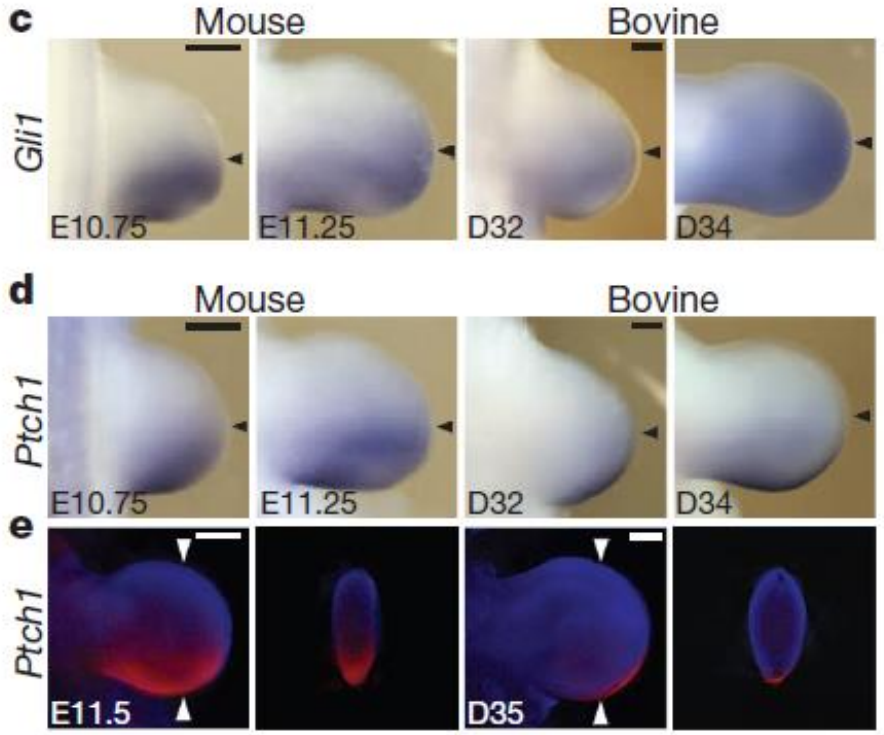
Rappel
sur la voie de signalisation
Shh

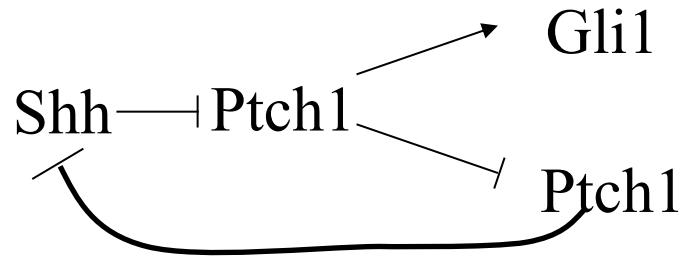


Chez les Bovins, le gradient de Shh est altéré par manque de rétrocontrôle inhibiteur de Ptch1



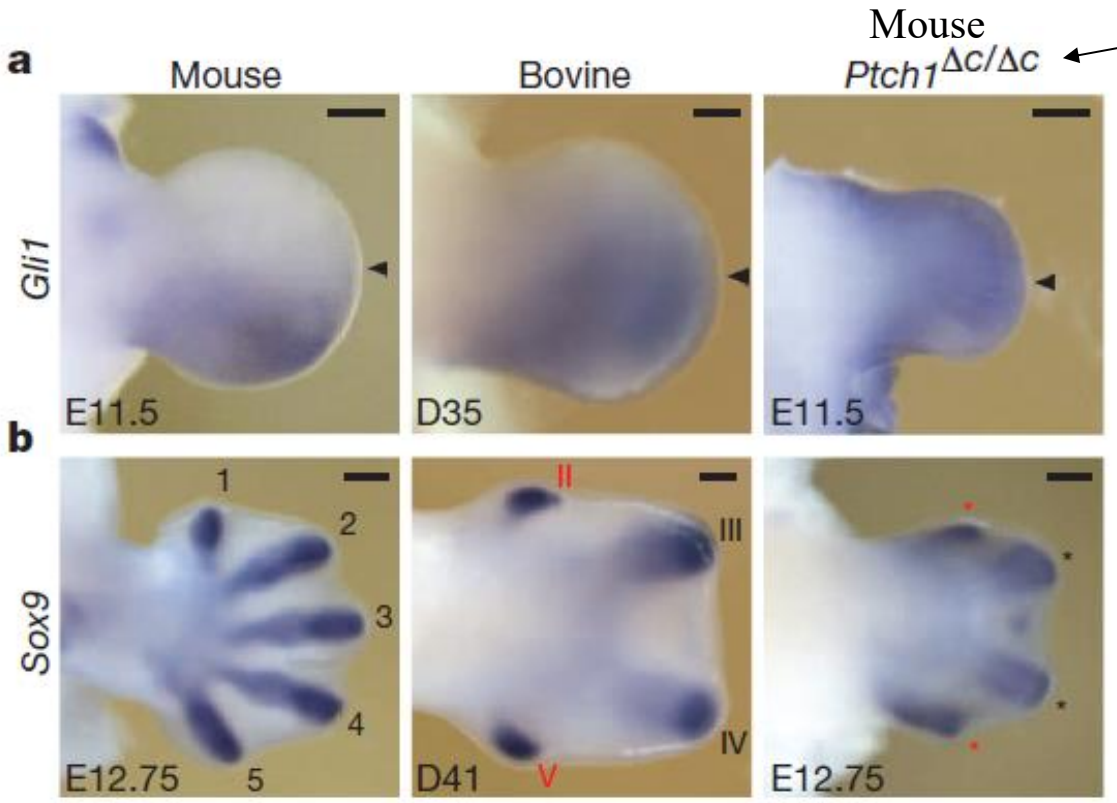






doi:10.1038/nature13289

Comment transformer une patte de souris en patte de vache



Mutation
qui rend
l'expression
de *Ptch1*
moins sensible
à la voie de signalisation
Shh

doi:10.1038/nature13289

Effet du remplacement d'un enhancer de souris par un enhancer de serpent dans les séquences régulatrices de *Shh*

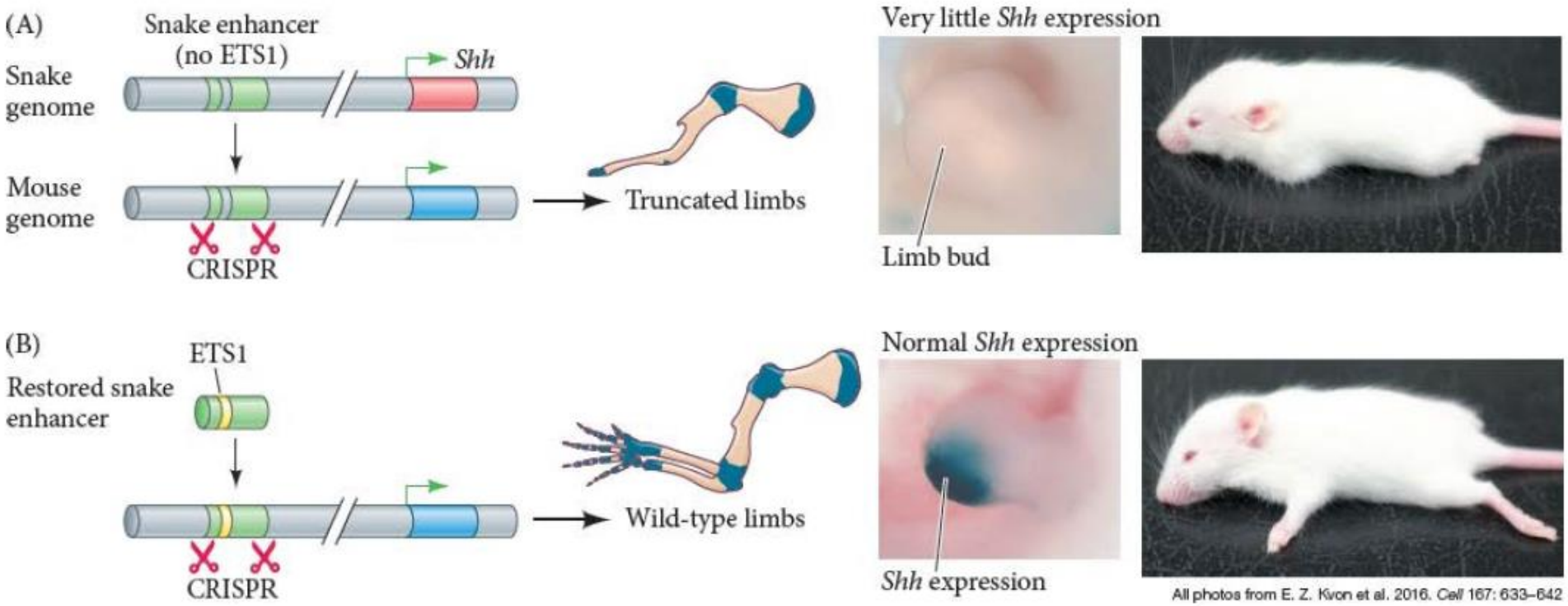
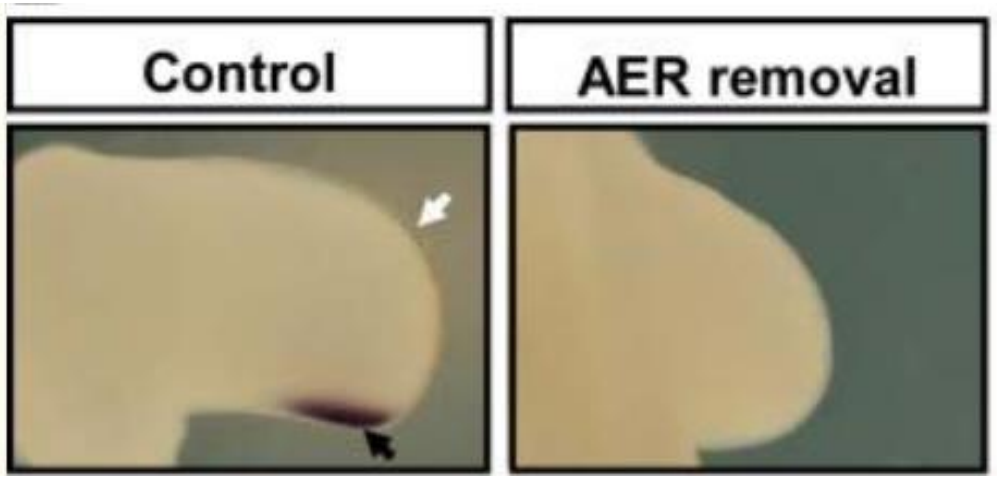


FIGURE 25.10 (A) The snake limb enhancer for *Shh* is missing an element (ETS1) that is crucial for directing limb development. When the snake *Shh* enhancer replaces the mouse *Shh* enhancer in embryonic mice, very little Shh (dark blue) is seen in the limb buds, and the mouse develops a truncated limb. (B) If the missing ETS1 site from the mouse *Shh* enhancer (or other reptilian *Shh* enhancers) is added to the snake enhancer, it functions normally, directing mouse *Shh* expression in the limb buds and making full-length limbs. (After E. Z. Kvon et al. 2016. *Cell* 167: 633–642.)

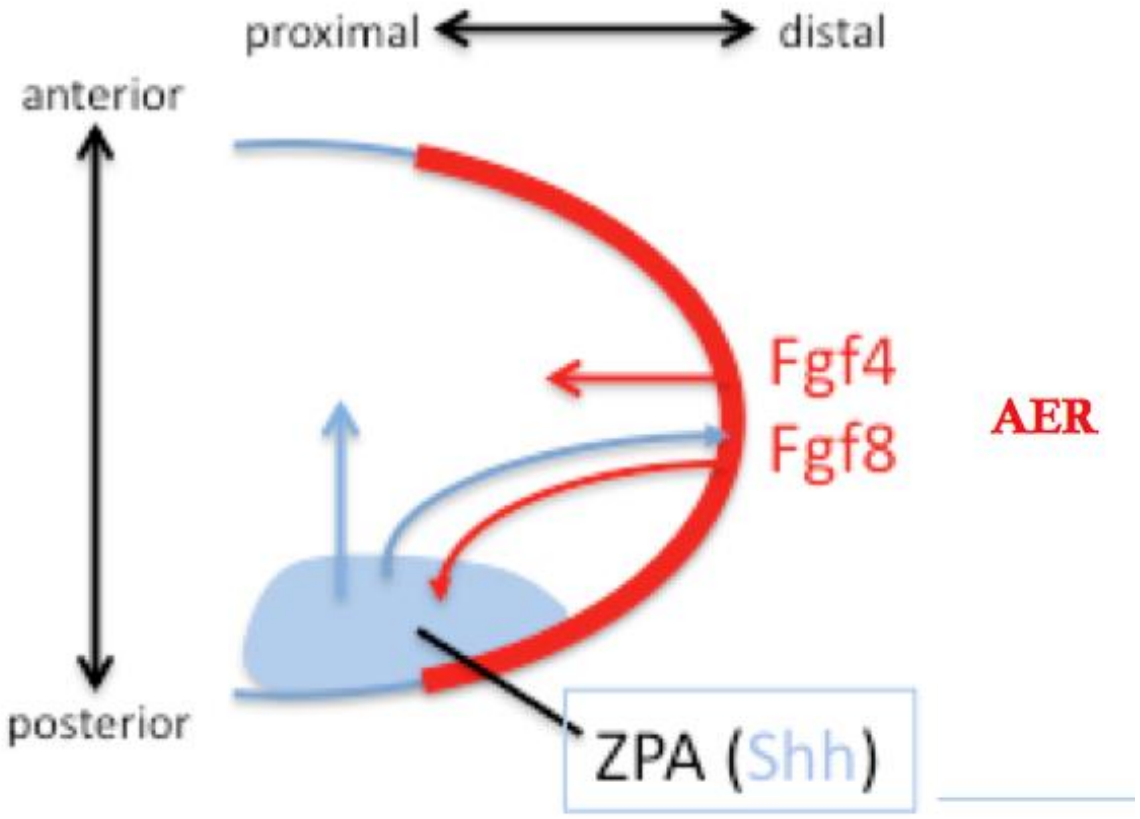
Developmental Biology, Gilbert (12th edition)

Effet de l'ablation de l'AER sur l'expression de Shh dans la ZPA

Shh



Les FGF de l'AER et Shh de la ZPA maintiennent mutuellement leur expression



Partie 5
Régionalisation selon les axes du bourgeon de membre

La crête ectodermique apicale (AER), un épaississement ectodermique distal, produit des facteurs de croissance FGF (notamment FGF4 et FGF8) essentiels à la croissance du bourgeon.
L'AER maintient une zone de prolifération mésenchymateuse sous-jacente. Un gradient d'acide rétinoïque provenant du tronc spécifie les identités proximales (en activant l'expression des facteurs de transcription Meis 1/2),
tandis que les FGF de l'AER induisent les structures distales (en inhibant l'expression de Meis 1/2).

Plus en aval, une partie des complexes *HoxA* et *HoxD* régulent la régionalisation proximo-distale selon la règle de colinéarité : les gènes en 3' (comme *Hoxa9*) spécifient les régions proximales,
tandis que les gènes en 5' (comme *Hoxa13* et *Hoxd13*) spécifient les éléments distaux (les doigts).

La zone d'activité polarisante (ZPA), située postérieurement, sécrète Shh.
Sa greffe antérieure provoque une duplication miroir des doigts. La concentration et la durée d'exposition à Shh déterminent la spécification des doigts (pouce → petit doigt).

ZPA et AER se maintiennent mutuellement : Shh soutient l'expression des FGF dans l'AER
et les FGF soutiennent l'expression de Shh dans la ZPA.