

MSC

MATIÈRE ET SYSTÈMES COMPLEXES

**UMR 7057 associée au CNRS et à l'Université
Paris 7**

Partie I (Jean-Pierre Henry)

Jeudi 10 février : Cours I.1 Introduction des différents modèles animaux

Jeudi 3 mars : Cours I.2 Les cellules souches

Jeudi 17 mars : Cours I.3 Le modèle de la drosophile

Jeudi 31 mars et 28 avril : Cours I.4 et I.5 Quelques mécanismes généraux

Partie II (Vincent Fleury)

Jeudi 5 mai : Cours II.1 Mouvements morphogénétiques lors des premières étapes de la formation des vertébrés

Jeudi 19 mai : Cours II.2 Rectification des inductions de différenciation par les contraintes, ou comment les champs de contraintes forcent les types cellulaires à bien habiller l'embryon.

INTRODUCTION À LA BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT

-5-

Et pour finir, quelques systèmes plus complexes

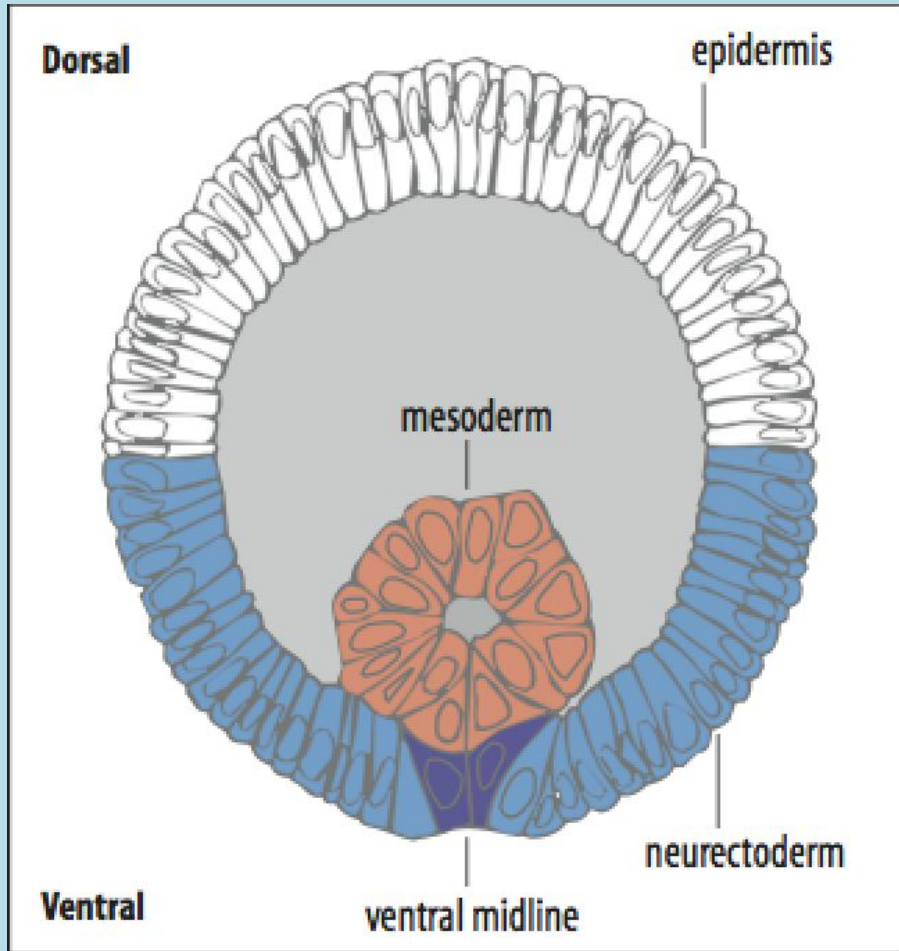
Jean-Pierre HENRY
28 Avril 2011



Résumé du cours précédent

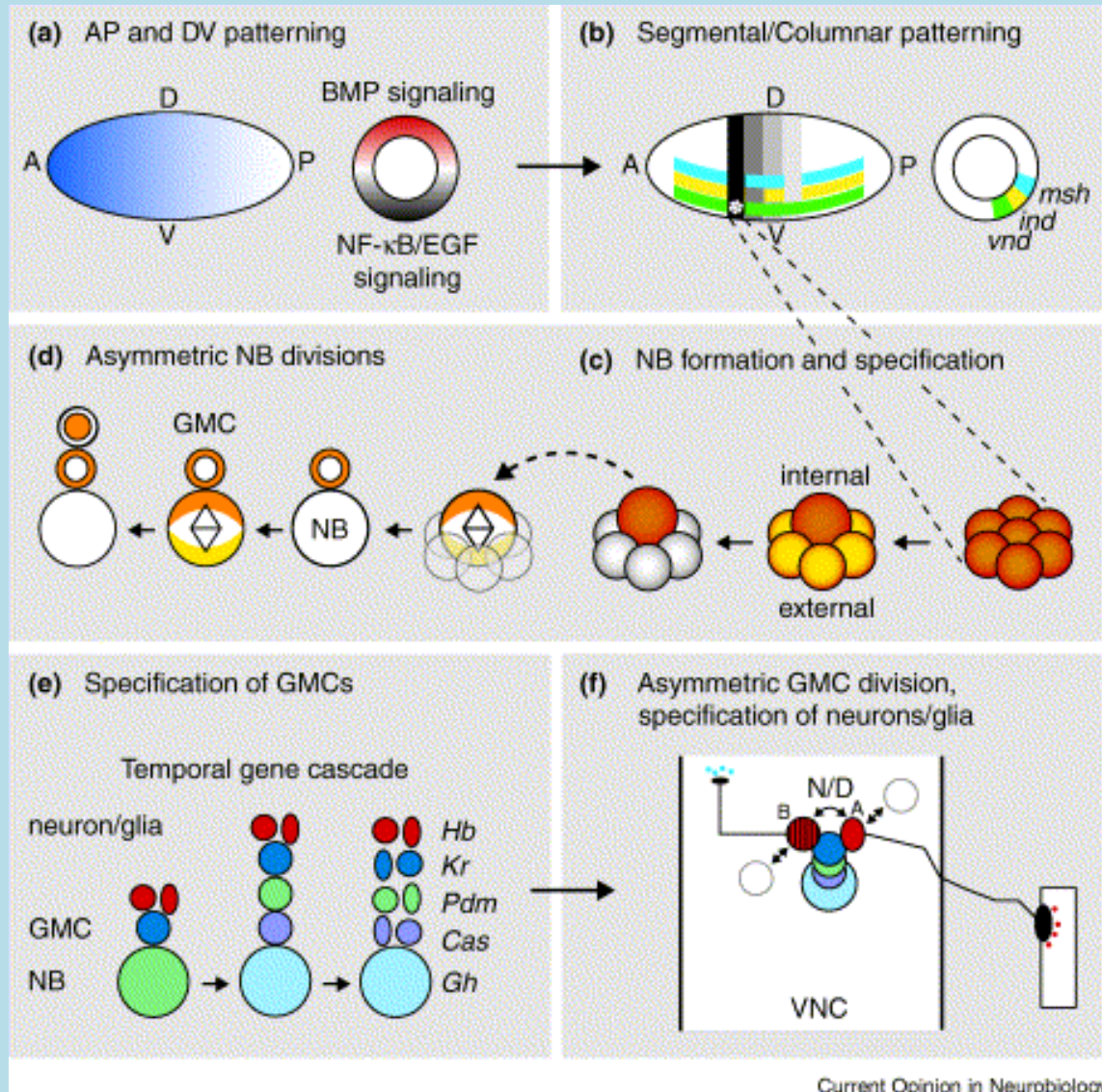
- La génétique de la Drosophile nous a montré comment les règles générales d'organisation se définissaient
 - Des macromolécules (ARN, protéines) jouent le rôle de morphogènes
 - Leur diffusion crée des gradients
 - La lecture de ces gradients par les cellules leur donne une information de position
- Les cellules utilisent les outils dont elles disposent (adhérence, cytosquelette, systèmes contractiles) pour traduire ces informations en terme d'organisation coordonnée
- Dans le cours précédent, nous avons mis l'accent sur les mouvements concertés très visibles pendant le développement
- Nous allons voir si la même logique se retrouve dans l'organisation des autres organismes

L'émergence du système nerveux chez la drosophile

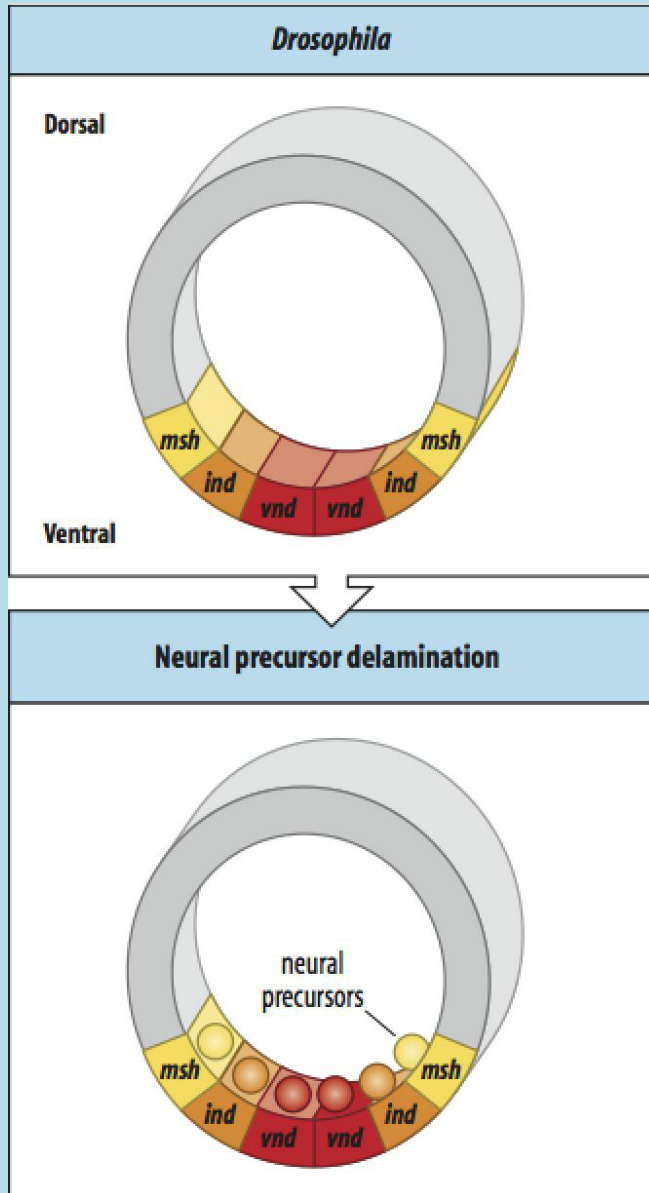


- Au stade de la « cellularisation » de la blastula, on a, sur la face ventrale, le territoire mésodermique (au centre), puis, latéralement, deux bandes de « neuroectoderme »
- À la gastrulation, le mésoderme est internalisé
- Chez les invertébrés, le système nerveux est ventral (sous le tube digestif)
- Comment sont spécifiées les cellules nerveuses par rapport à l'épiderme?

Un processus en plusieurs étapes

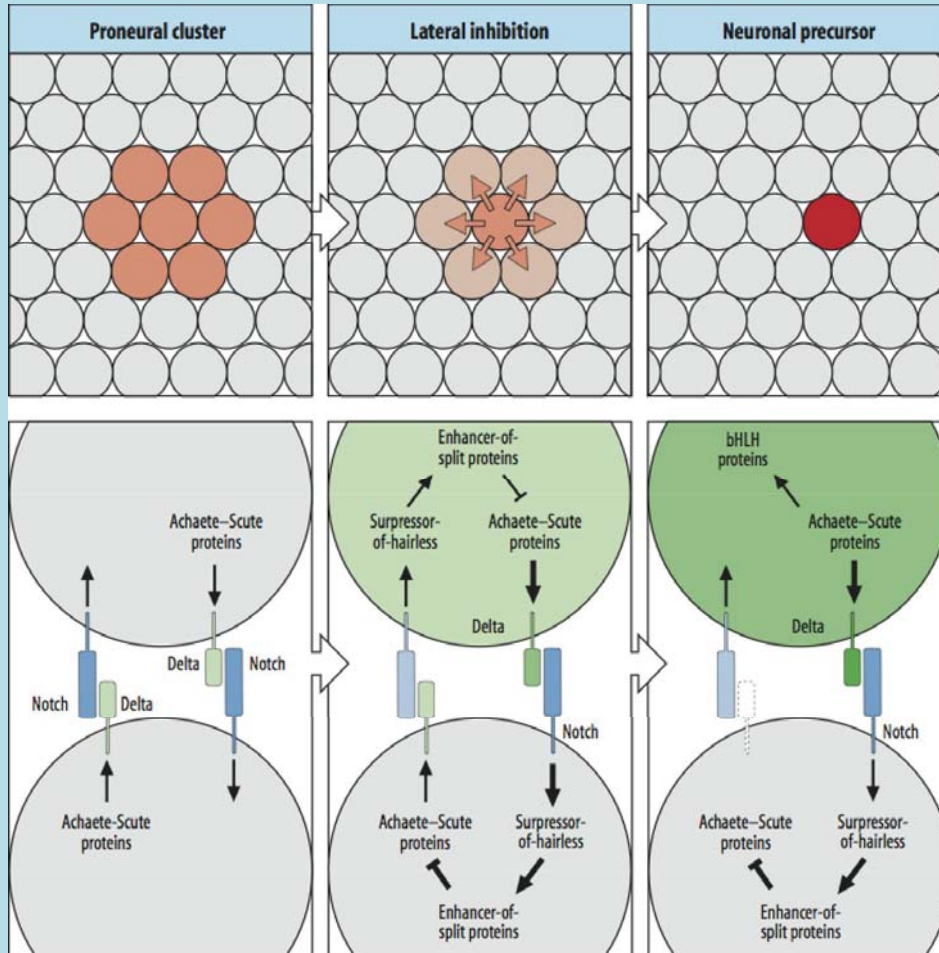


Un déterminisme génétique « territorial »



- Chaque segment va tout d'abord apporter son identité selon l'axe A-P
- Ensuite, le neuroectoderme va être divisé en territoires (colonnes) selon l'axe D-V
- Trois différentes colonnes sur chaque hémisegment
- On a ainsi des territoires avec des identités génétiques non équivalentes (qui donneront des neurones différents)
- Dans chaque territoire, les cellules vont acquérir un complexe génétique qui les rendra **toutes** compétentes pour devenir des neurones (*achaete-scute*)
- Comment se fait le choix entre neurones et cellules épidermiques ?

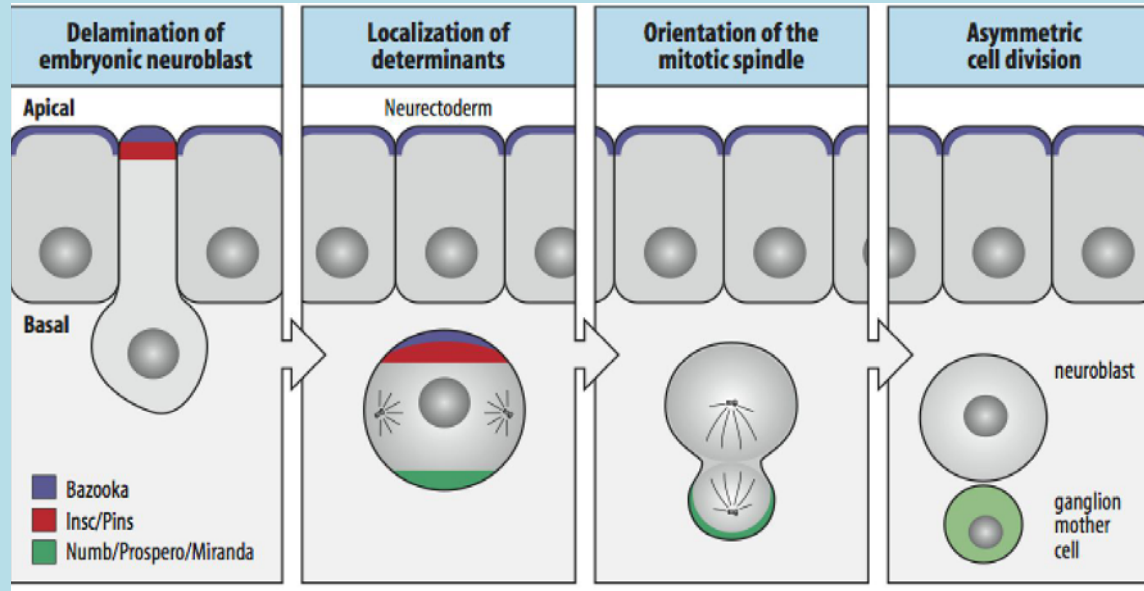
Un choix par inhibition latérale



- Toutes les cellules peuvent communiquer par un système de signalisation membranaire, Notch-Delta
- Lorsque un complexe intercellulaire se forme, la partie intracellulaire de Notch est coupée et agit comme un facteur de transcription
- Si une cellule exprime plus de Delta, les voisines auront un signal Notch renforcé, une inhibition de *achaete-scute* et de *delta*
- Elles ne deviendront pas neuroblastes

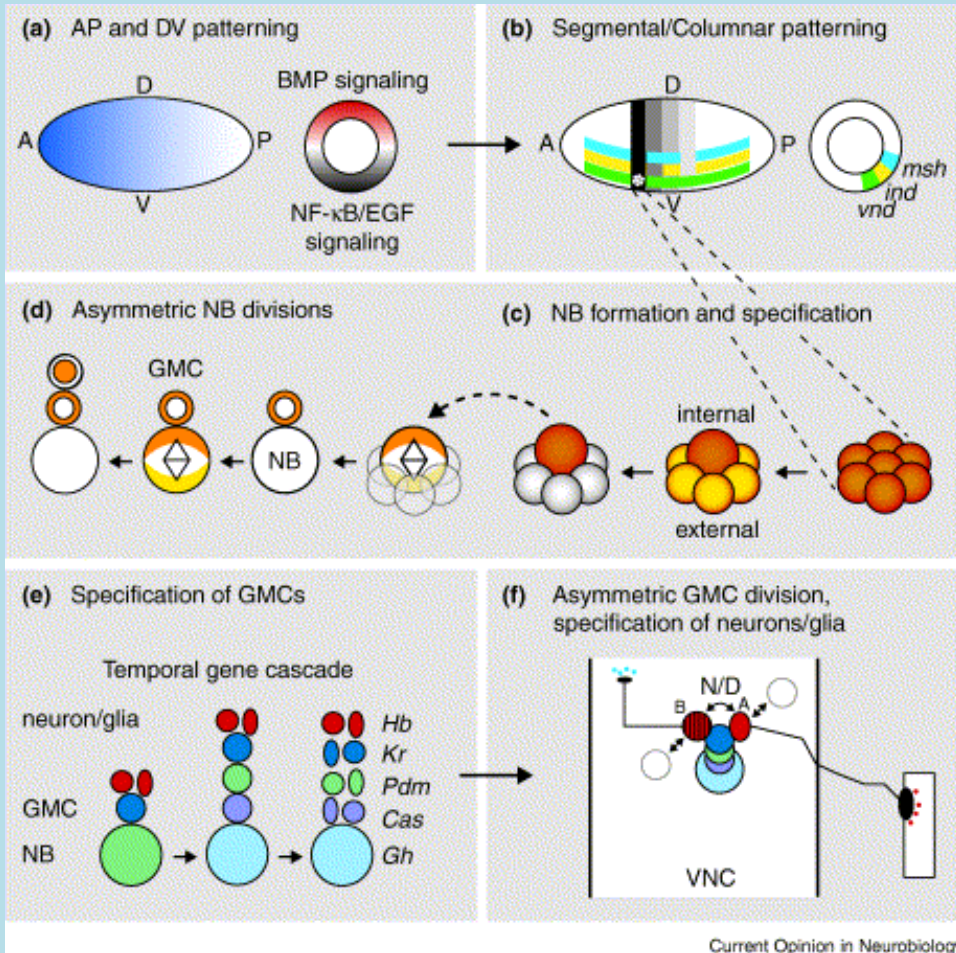
L'intervention du hasard?

Le neuroblaste, un fonctionnement en cellule souche



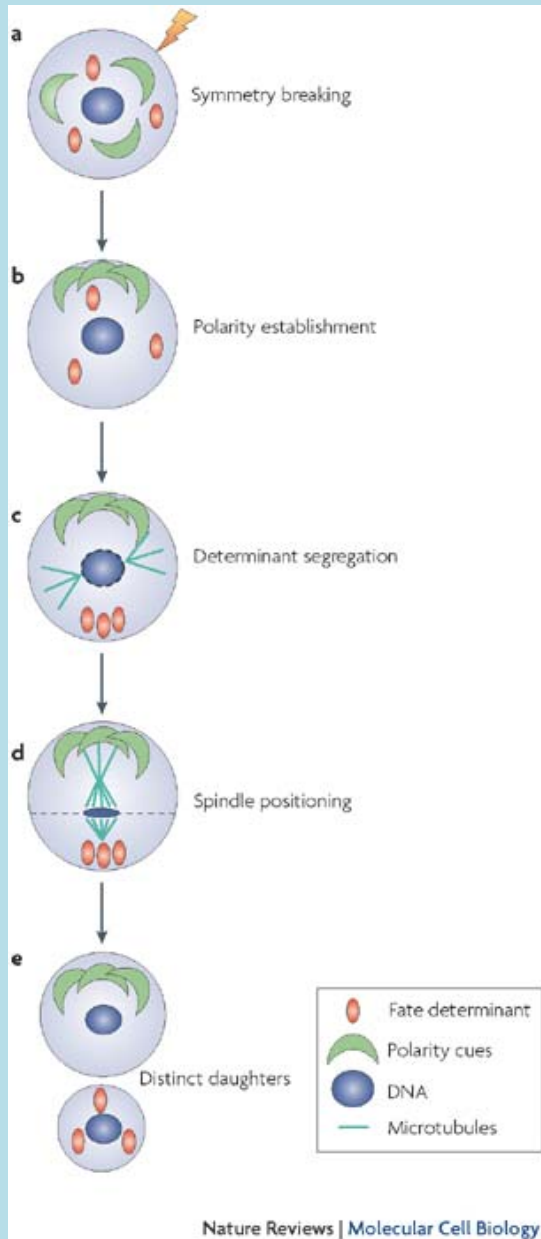
- L'inhibition latérale conduit à 30 neuroblastes par hémisegment
- Ceux-ci vont quitter l'épithélium, puis subir une division asymétrique, donnant une cellule identique à sa mère et une cellule ganglionnaire mère
- Cette dernière ne fera qu'une division (asymétrique) donnant 2 neurone ou cellule gliale
- Les 60 neuroblastes d'un segment donnent environ 700 neurones et 60 cellules gliales

Une organisation de la diversité neuronale



- Un neuroblaste va produire des vagues de cellules ganglionnaires
- Les gènes d'organisation de l'embryon vont influencer ces vagues, qui ne seront pas équivalentes
- Un système de type Notch permettra aux cellules en place d'influencer les nouvelles venues
- Cette diversification est déjà associée avec une localisation géographique

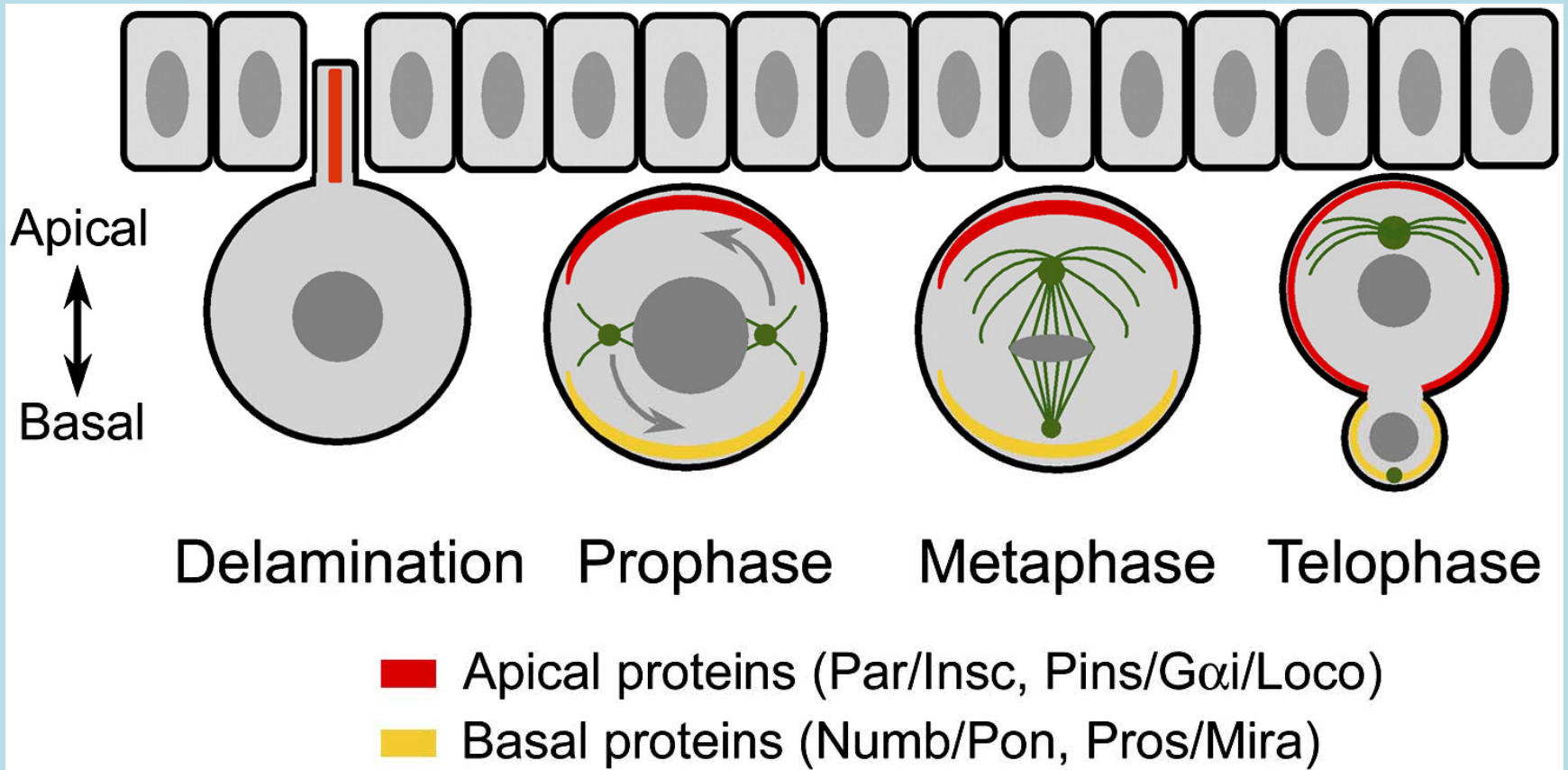
La division des neuroblastes: un exemple d'asymétrie



- La mitose asymétrique suppose plusieurs étapes:
 - Un événement initial de rupture de symétrie
 - L'établissement d'une polarité
 - La ségrégation de déterminants
 - Le positionnement du fuseau mitotique
 - La séparation de deux cellules filles non équivalentes
- L'annélide *C. elegans* et la drosophile sont les meilleurs modèles pour étudier ce phénomène

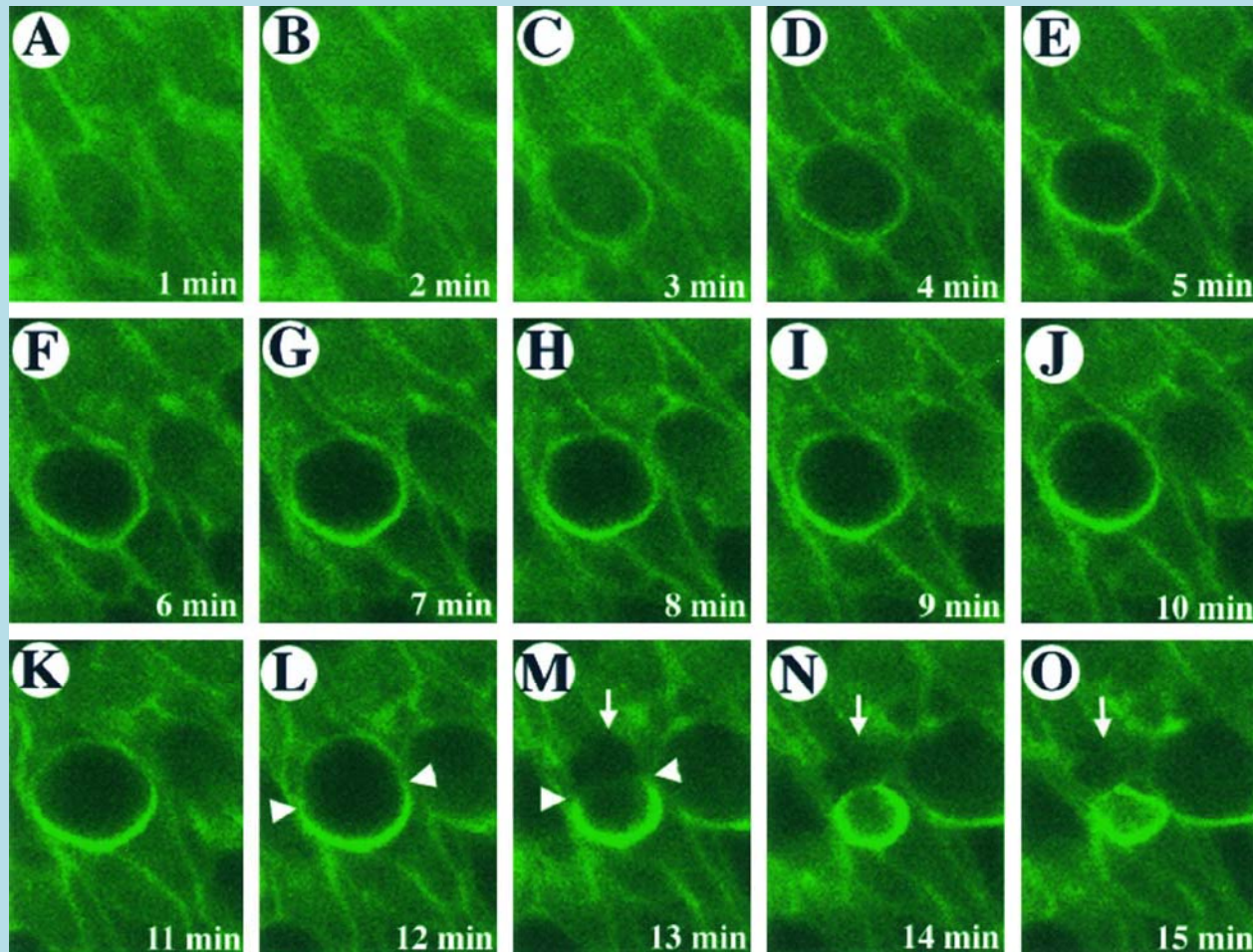
(P Gonczy (2008) *Nature RevCellBiol*, 9, 355)

Les différentes étapes



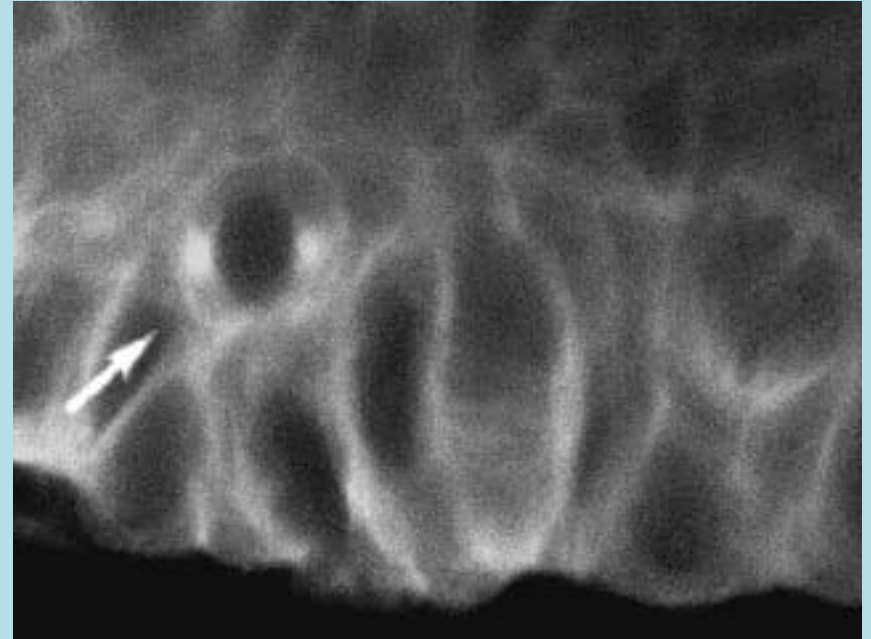
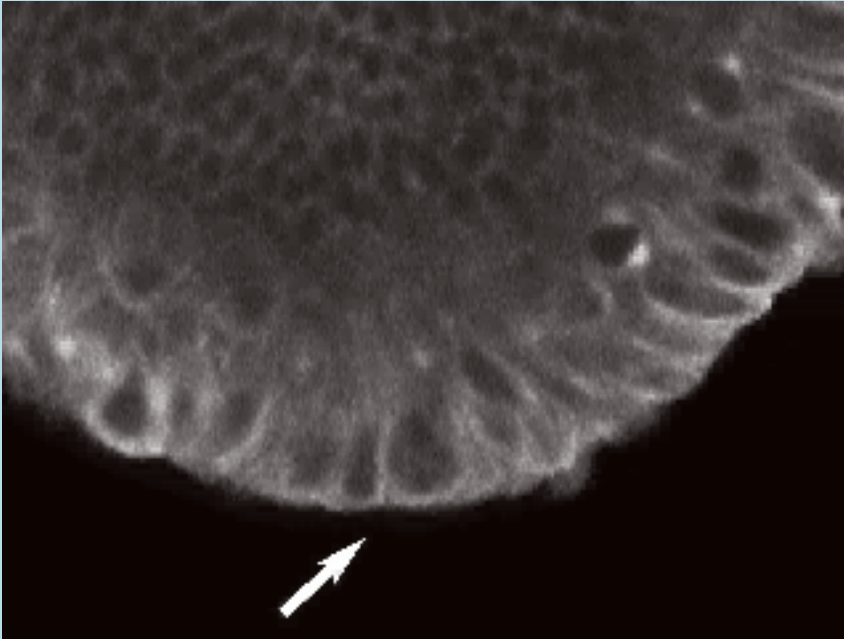
- Les cellules épithéliales sont polarisées dans le sens apical-basal: certaines protéines associées avec cette polarisation (Par) orientent la cellule qui quitte l'épithélium
- D'autres sont recrutées (Pins, Gα, ...), capables de lier le cytosquelette

Recrutement d'une protéine basale, PON



- La protéine PON-GFP est diffuse dans le cytoplasme (A); puis, corticale répartie (E); elle va former un croissant à la partie basale (K,L); la mitose commence (M) et PON va uniquement sur la cellule ganglionnaire maternelle

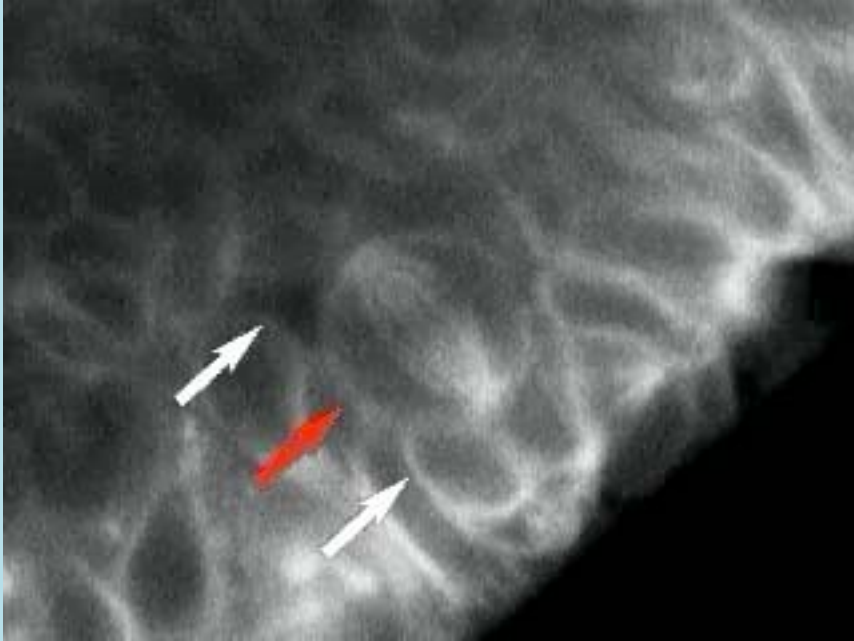
La rotation du faisceau mitotique



- À gauche, épidermoblaste, l'axe du faisceau est parallèle à la surface du tissu
- À droite, neuroblaste « délaminé », le faisceau tourne à 90° après la métaphase; le sens de la rotation est aléatoire

(Kaltshmidt et al (1999) Nature CellBiol, 2, 7)

Des cellules filles différentes!



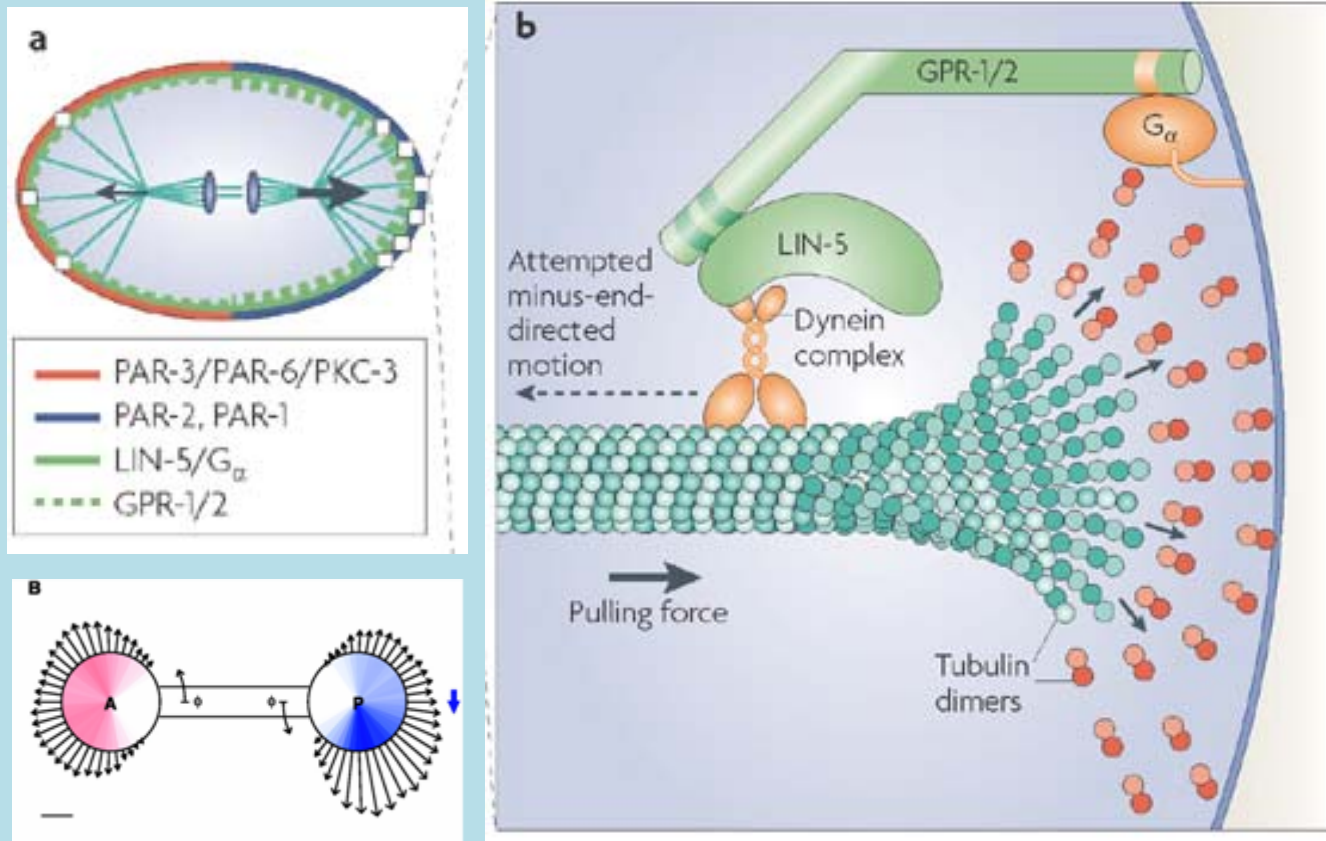
- La différence de taille est corrélée avec un faisceau asymétrique
- Le descendant neuroblaste garde les déterminants de prolifération
- Transplantés dans une mouche, ces cellules ont une croissance anarchique et peuvent former des tumeurs malignes envahissantes

Comment faire tourner le faisceau ? (1)



- La première division chez *C. elegans* est asymétrique (cours1)
- Au stade de l'anaphase, le plan équatorial du faisceau n'est pas dans le plan de symétrie
- La tubuline du faisceau est attachée aux deux centrosomes polaires; on détruit avec un laser un centrosome et on mesure la tension du faisceau par le recul de la tubuline fluorescente

Comment faire tourner le faisceau? (2)

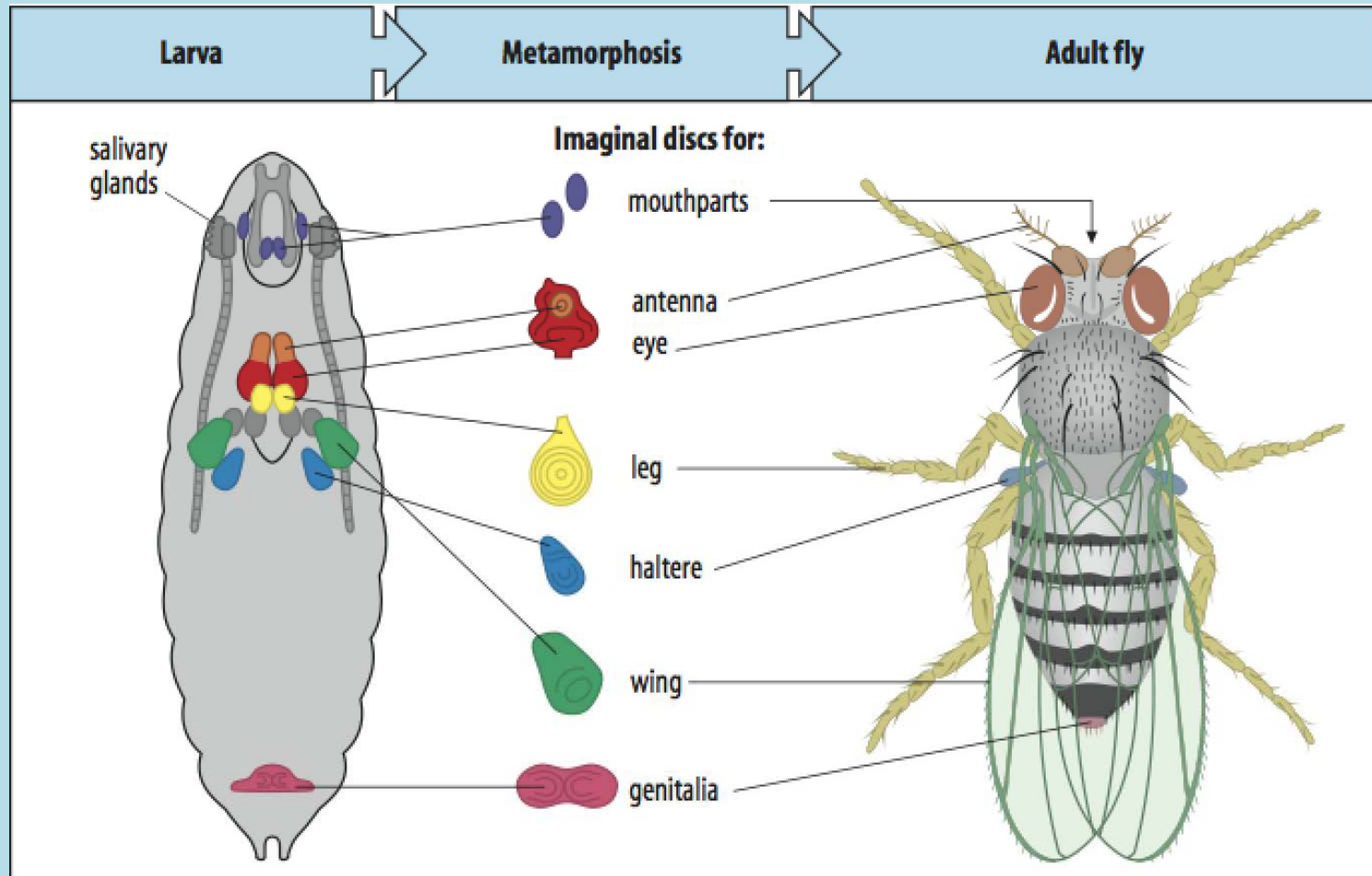


- Les résultats de l'expérience précédente (à gauche, bas) montre que la tension exercée sur le centrosome postérieur est supérieure et résulte d'un plus grand nombre de « générateurs de force »
- Ceux-ci sont des sites d'attachement de la tubuline au niveau des protéines de polarisation

Croissance et morphogénèse dans le disque imaginal allaire

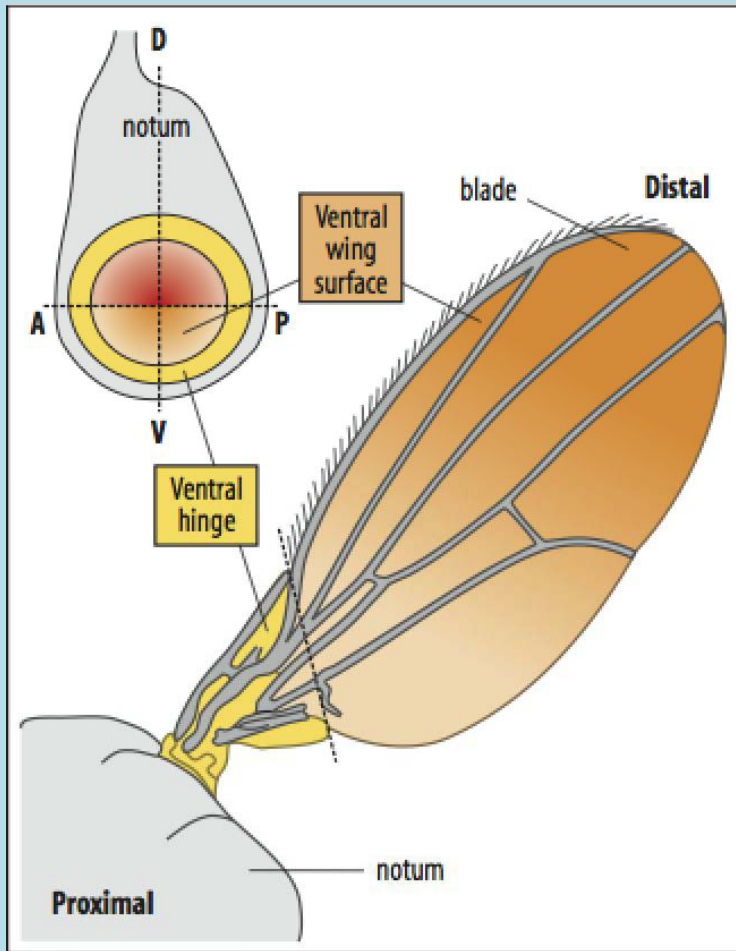
Comment on passe du projet à la réalisation

Les disques imaginaux



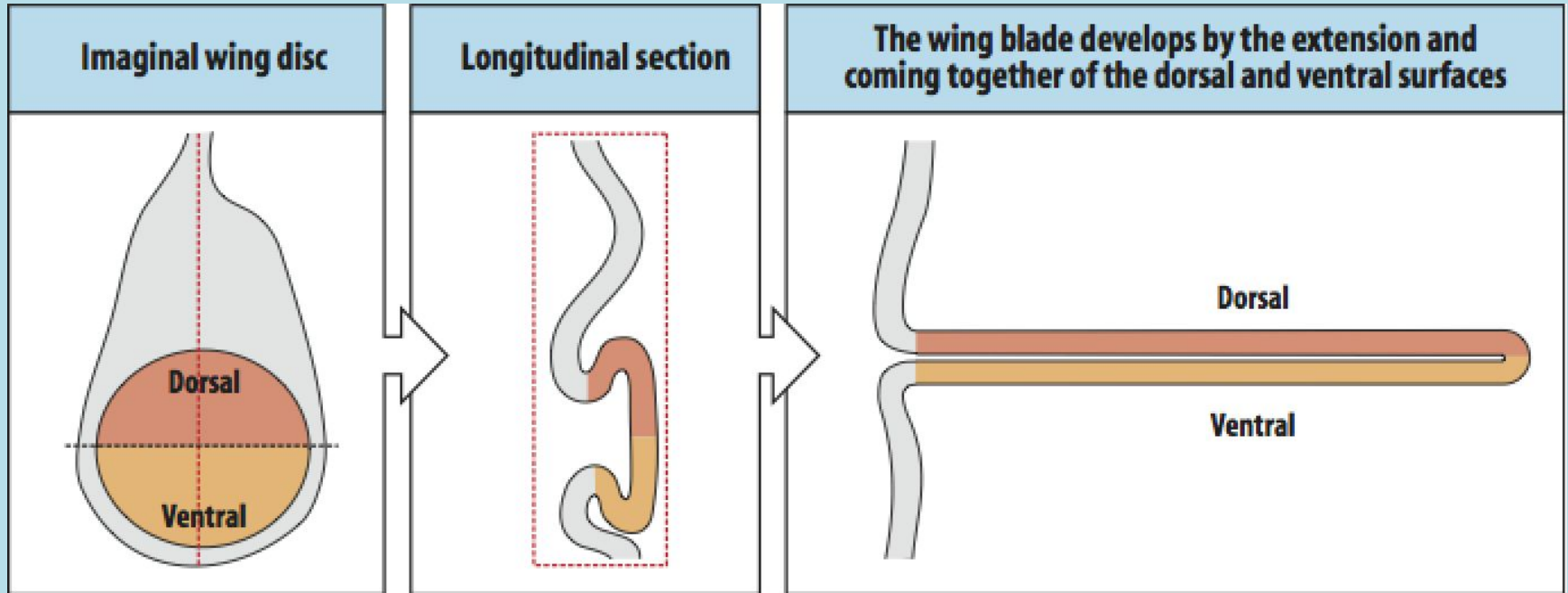
- Jusqu'ici, nous avons observé le stade embryonnaire; celui-ci va aboutir à une première larve (instar). Avant la mouche, il y aura deux autres instars, puis une pupe.
- Chez la larve, les organes de l'adulte s'organisent dans des amas de cellules, les disques imaginaux

Carte des territoires du disque allaire



- Au départ, le disque comporte une quarantaine de cellules
- A l'arrivée, il y en a 50 000
- C'est donc un bon système pour se poser les questions de la croissance (organisation, arrêt) et de la morphogénèse
- L'aile représente l'ellipse jaune + orange, organisée autour d'axes A-P et D-V
- Le notum correspond à la surface du thorax

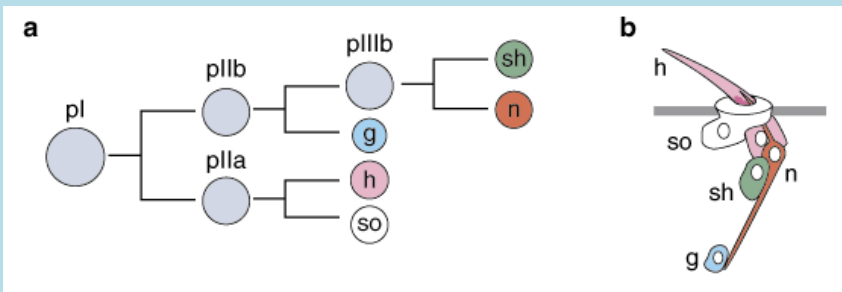
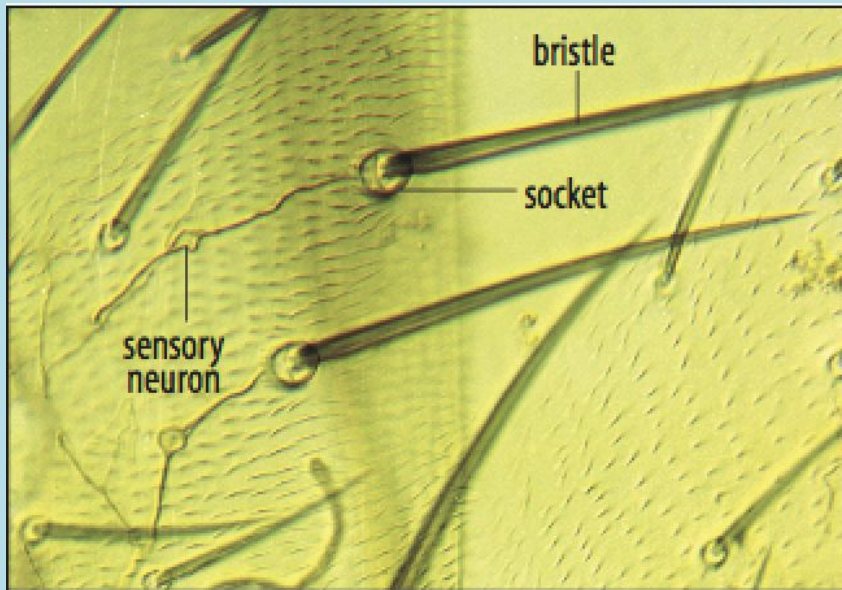
Devenir du disque



- L'aile va se former par invagination du disque, puis pliage autour de l'axe dorso-ventral
- Sa structure est celle d'un double épithélium
- La détermination des axes est donc un point très important, sous contrôle génétique
- Avant d'aborder cette question, nous allons nous intéresser aux soies sensorielles et retrouver la neurogénèse

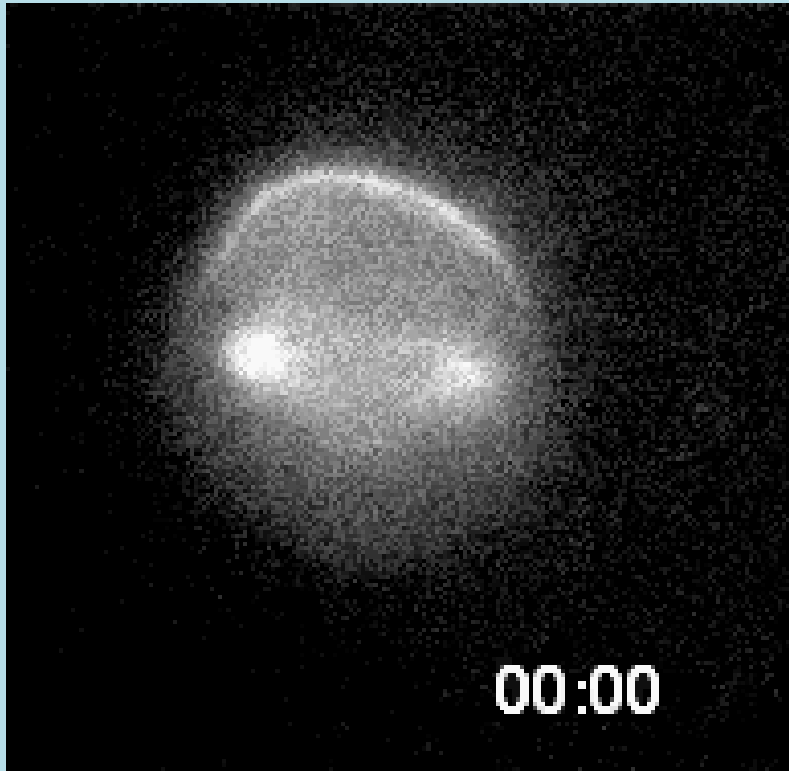
Les soies sensorielles

- Sur le thorax (notum) et sur les ailes, on voit: i) des poils nombreux, régulièrement espacés et tous orientés vers l'arrière; ii) des soies, plus longues, aussi orientées, reliées à des neurones sensoriels
- La neurogénèse de ces organes est contrôlée comme déjà vu, par un « damier » de gènes
- Il y a aussi des **mitoses asymétriques**, mais **dans le plan**
- Un précurseur (pi) va donner une gliale (g), un neurone (n), et 3 cellules du cil : hampe (h), douille (so) et fourreau (sh)

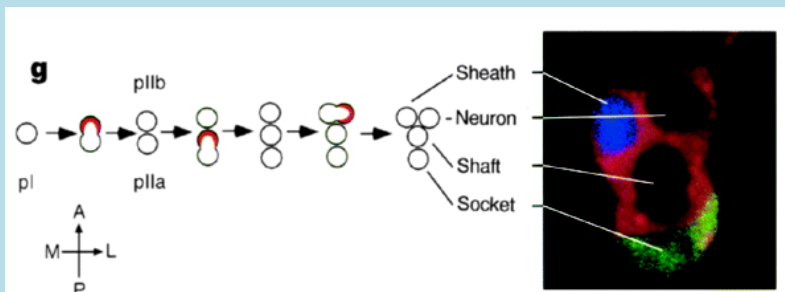


(Gho et al (1999) *Development*, **126**, 3573)

Mitose asymétrique du précurseur pi (1)

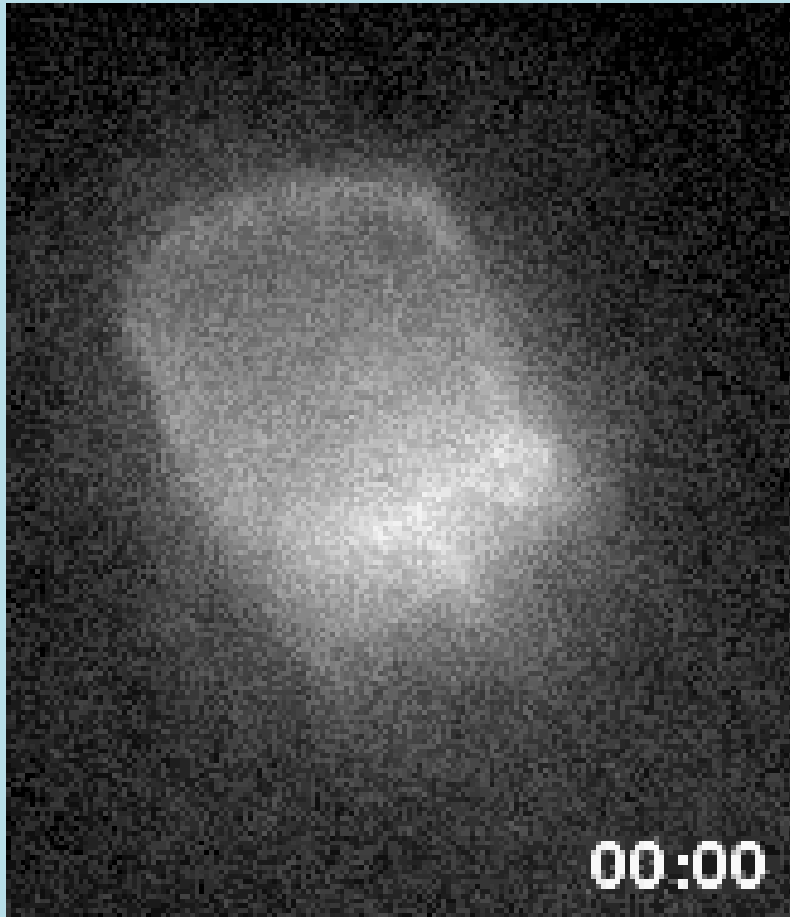


- Il y a 4 divisions asymétriques
- Dans toutes, l'axe de division (et l'axe du fuseau) est repéré par rapport aux axes A-P et D-V
- Comme pour le neuroblaste, des protéines marquent la polarisation (croissant antérieur)
- Dans cette expérience, il y a aussi un marquage de la tubuline (faisceau)
- Remarquez que la protéine marquée passe complètement dans une fille: pIIb, antérieure et plus petite

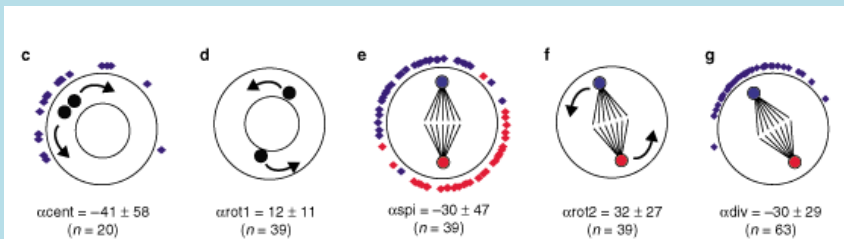


(Bellaïche (2001) *Nature Cell Biol*, **3**, 50)

Mitose asymétrique du précurseur pi (2)

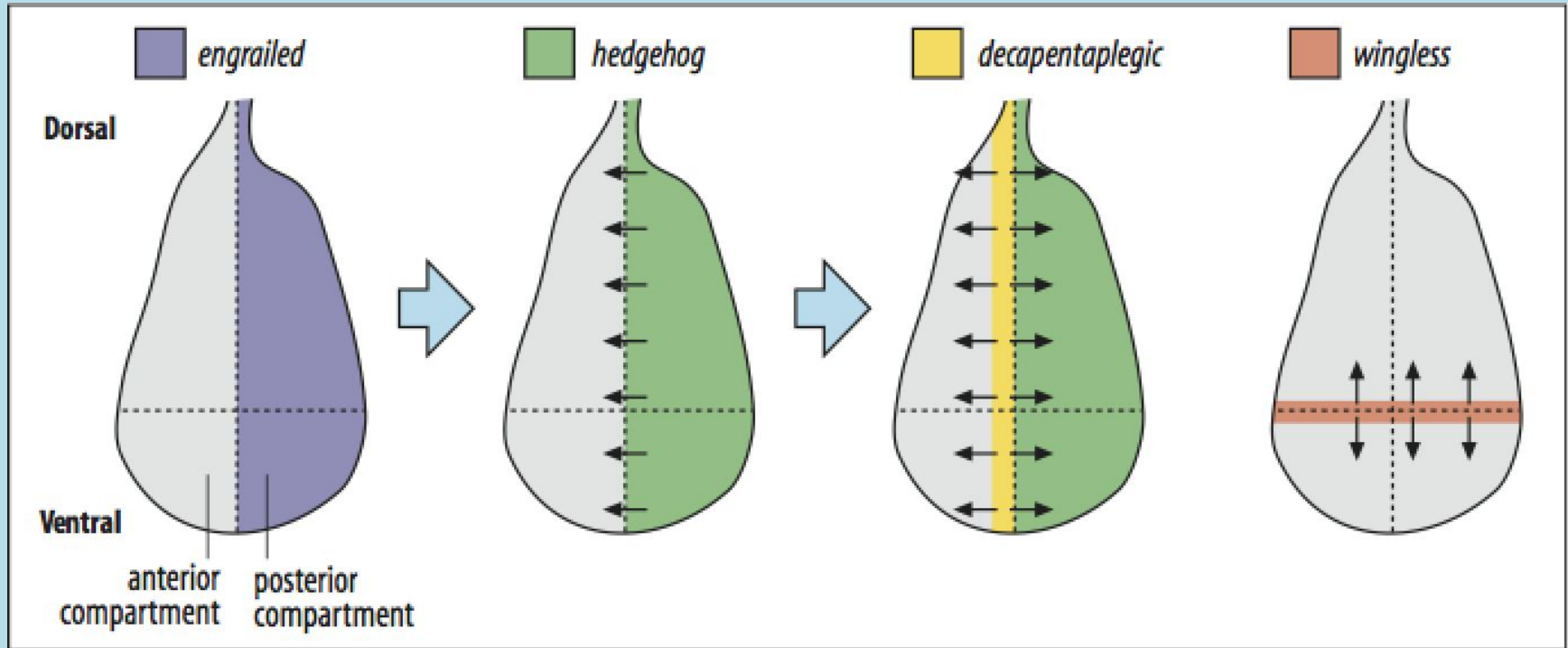


- Au cours de cette division, le fuseau est orienté par la polarisation
- Initialement, les centrosomes apparaissent plutôt vers l'avant
- Ils vont tourner avant la formation du faisceau, puis à la fin de mitose (télophase)
- **Quelle est la boussole intracellulaire qui oriente la polarisation cellulaire?**
- C'est la « polarisation cellulaire plane » ou PCP



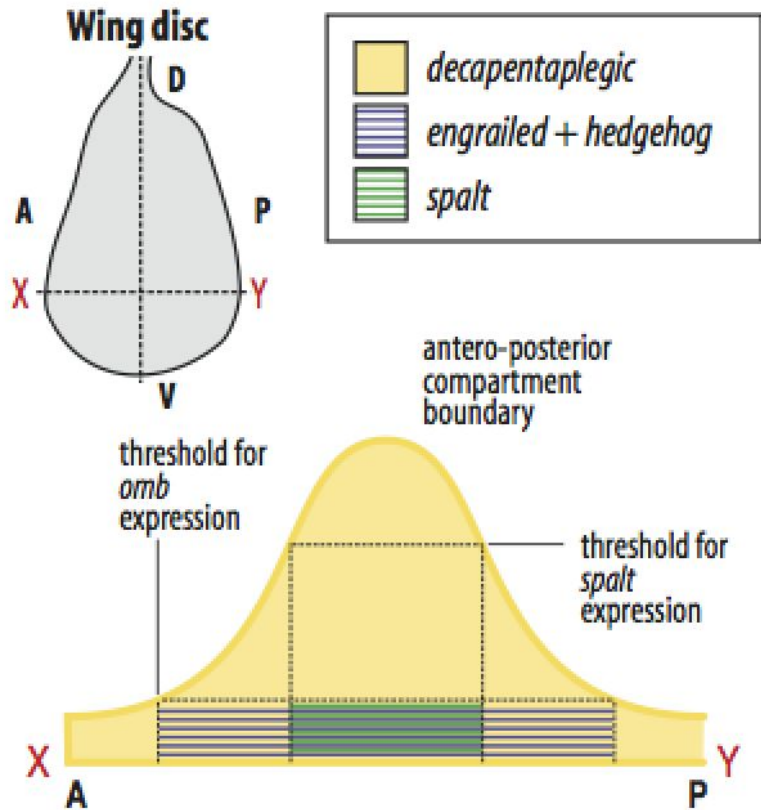
Marquage GFP-tubuline

L'organisation du disque allaire



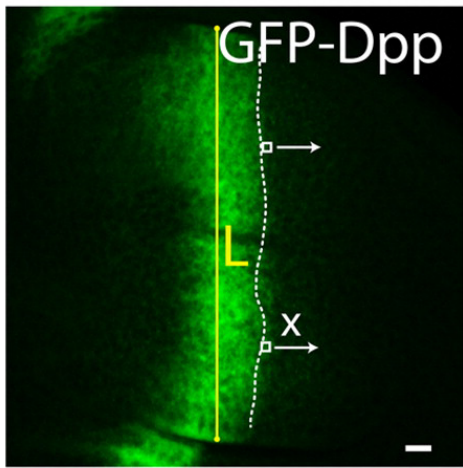
- Le disque est séparé en deux compartiments, correspondant aux deux parasegments dont il est issu
- Comme nous l'avons vu, à la frontière s'expriment les gènes de segmentation *engrailed*, *hedgehog* et *wingless*
- Le gène *decapentaplegic* sous leur contrôle agit comme un morphogène, sécrétant la protéine Décapentaplégic (M = 20 kD)

Decapentaplegic (DPP) et le drapeau français

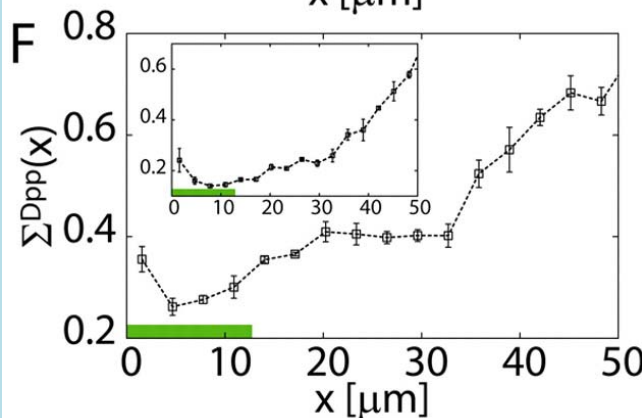
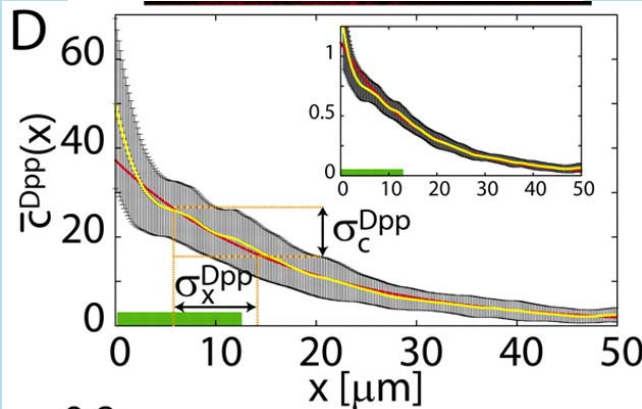


- Le modèle du drapeau français est proposé pour expliquer le contrôle de la forme selon l'axe A-P
- Mais ici, on a un épithélium formé: comment se forme le gradient de DPP ? Quelle est sa stabilité? Quelle est la précision de la lecture
- La diffusion est-elle extra-cellulaire, entre les cellules?
- Les réponses ont été obtenues à l'aide d'une protéine GFP-DPP

Gradient de Decapentaplegic

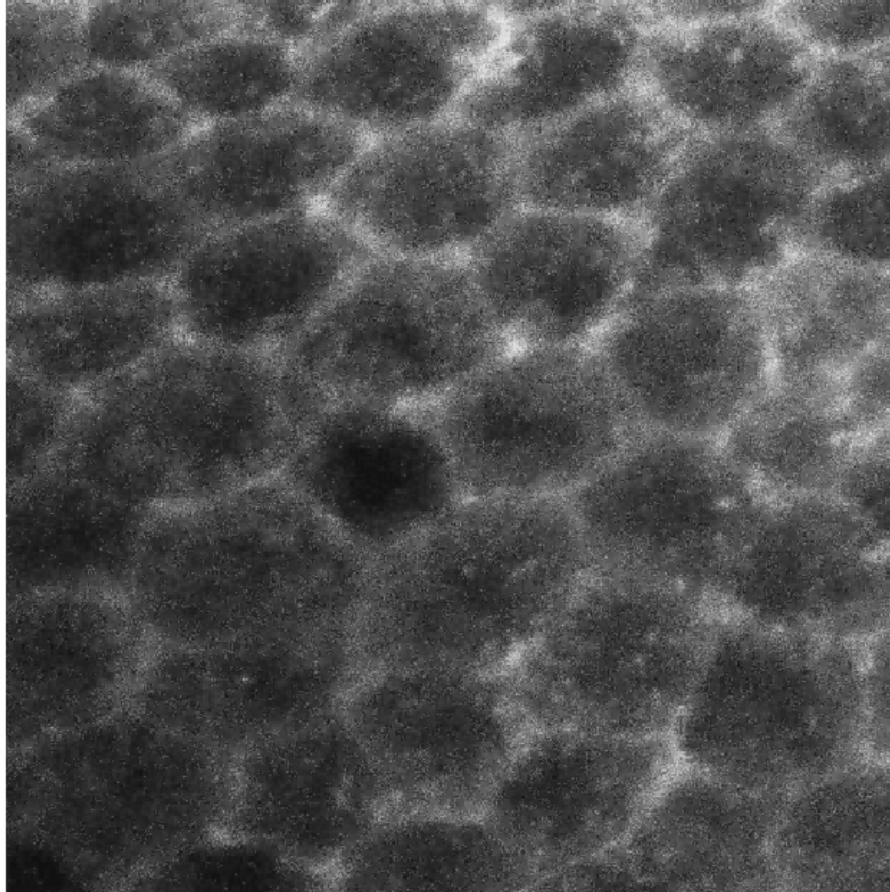


- GFP-DPP est retrouvé à 5 cellules de sa source (second instar), puis à 25 cellules, migrant à une vitesse > 4 cellules/h
- Ce déplacement ne correspond pas à une diffusion simple entre les cellules
- La forme du gradient est affecté en modifiant l'endocytose; DPP pourrait « traverser » les cellules (transcytose)
- Un autre travail évalue l'incertitude sur la position du gradient en fonction de la distance de la source
- σ_x varie entre 1,7 diamètre cellulaire (proximité de la source) à 3,7 diamètres (à une distance de 15 diamètres)



(Entchev et al (2000) *Cell*, **103**, 981; Bollenbach et al (2008) *Development*, **135**, 1137)

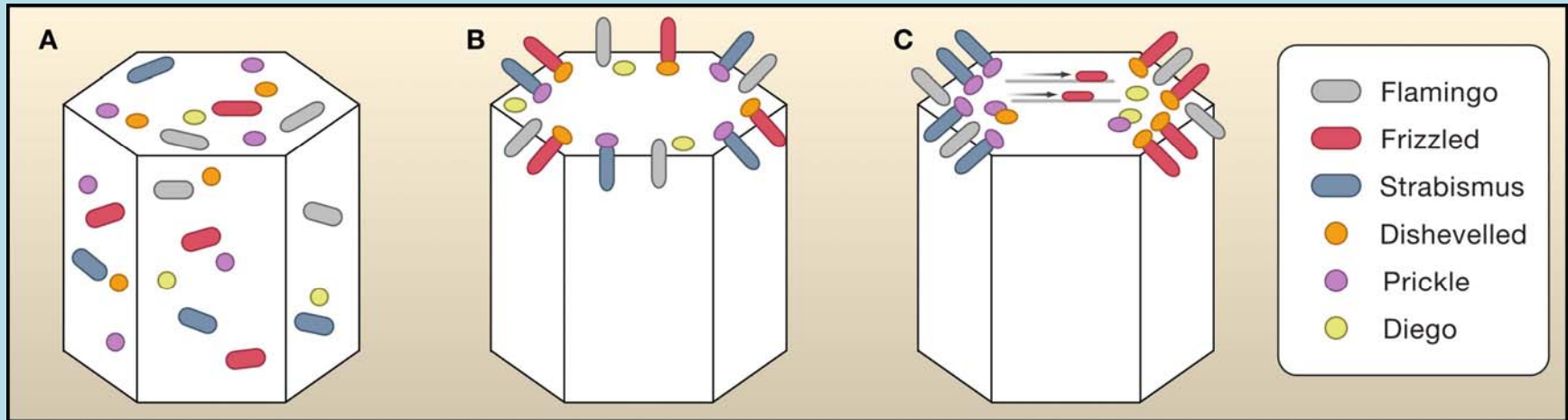
La Polarisation Cellulaire Plane (PCP) (1)



- Au cours du développement (pupe), les cellules épithéliales des ailes et du thorax se couvrent de « poils », différents et plus petits que les soies sensorielles, tous à l'arrière des cellules et orientés dans le même sens
- Il s'agit d'un système vectoriel, différent mais pas indépendant des gradients de morphogènes
- Il permet de distinguer un avant et un arrière des cellules, avec un axe relié aux axes généraux

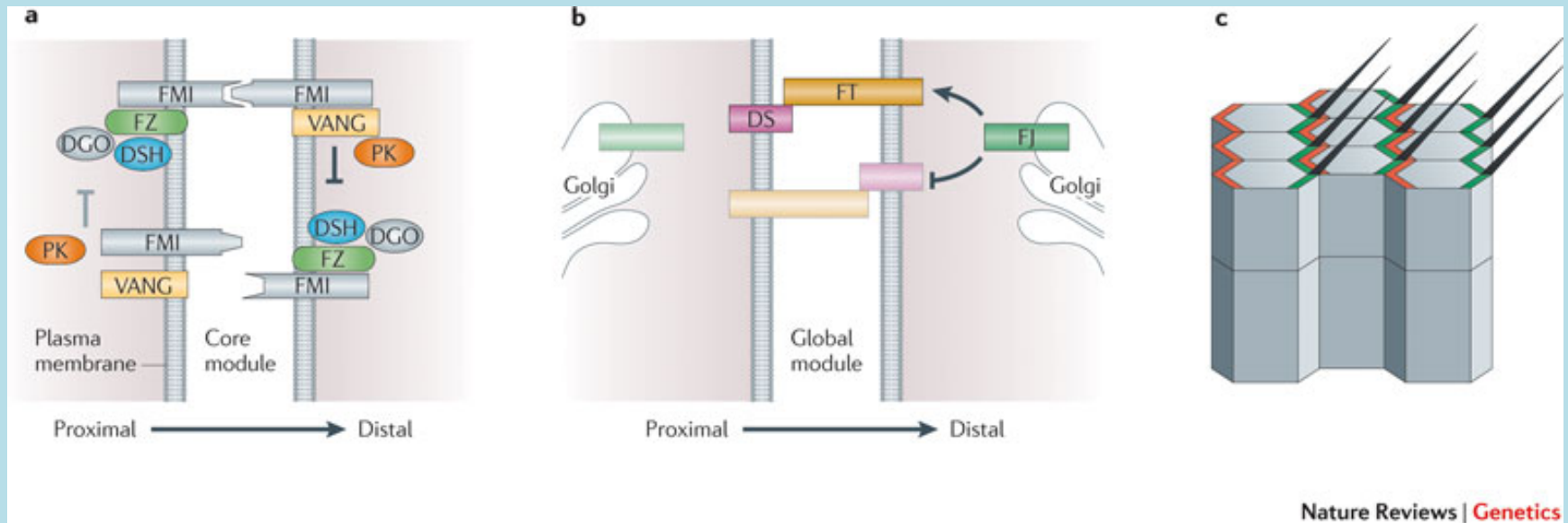
(Shimada et al (2006) DevCell, 10, 209)

La Polarisation Cellulaire Plane (PCP) (2)



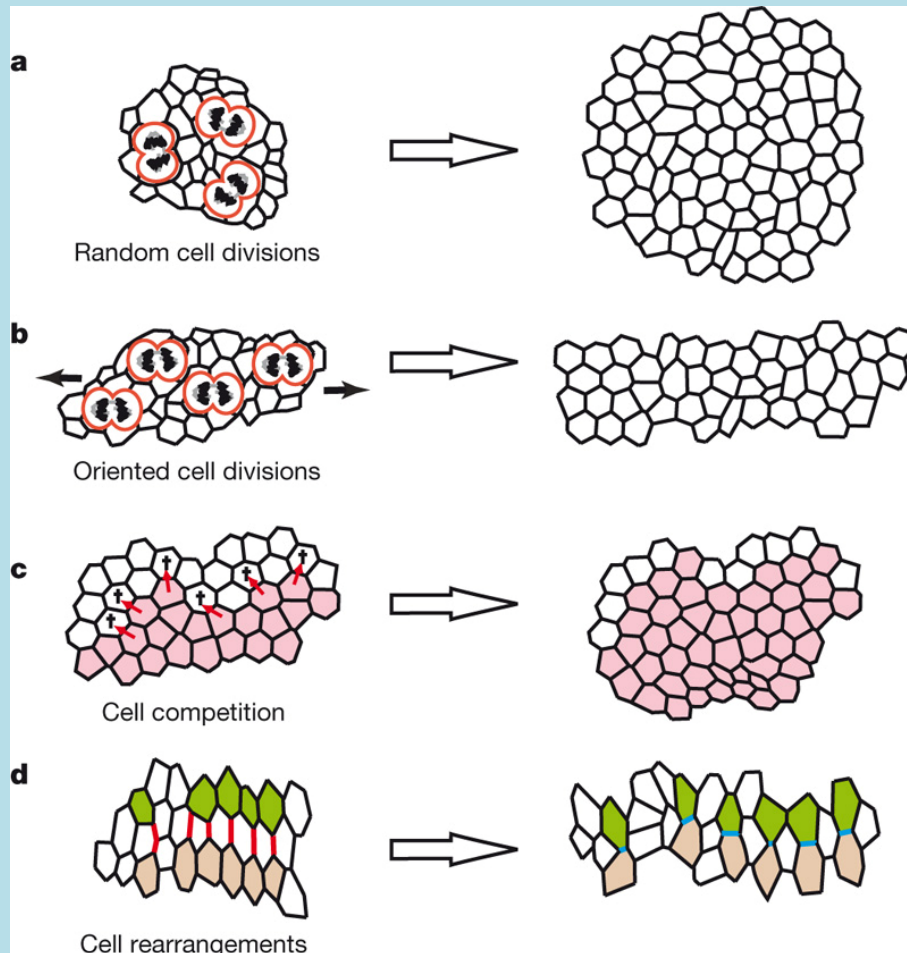
- Le mécanisme de la PCP fait débat; Il implique deux systèmes : le premier (core PCP) organise la polarisation dans la cellule
- Il se compose de protéines solubles et membranaires
- Dans un premier temps, toutes les protéines se rassemblent dans la zone corticale apicale
- Dans un second temps, des complexes se localisent à la partie antérieure et d'autres à la partie postérieure
- Deux types de mécanismes sont impliqués: un transport dirigé dans des vésicules le long de tubules orientés et des inhibitions mutuelles

La Polarisation Cellulaire Plane (3)



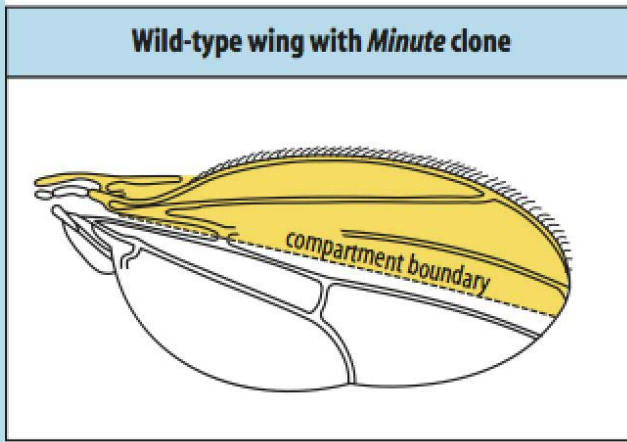
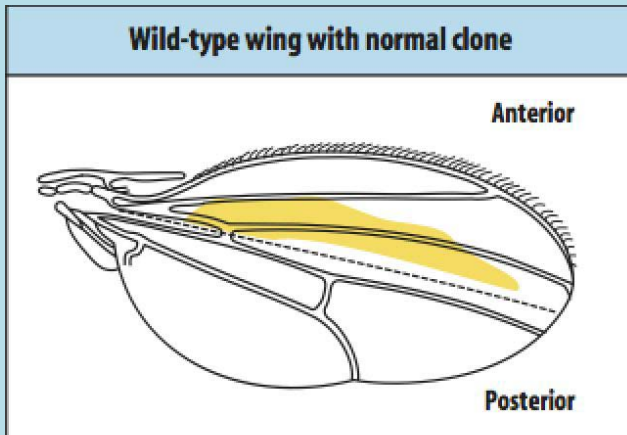
- L'étape suivante est de mettre en relation la polarisation cellulaire avec les axes du tissu
- Ceci se fait par un système à trois composants dont deux cadhérines atypiques formant des hétérodimères
- Une troisième protéine favorise une seule orientation; elle est sous le contrôle des gradients de morphogène

Croissance et morphogénèse (1)



- La croissance cellulaire va atteindre 50 000 cellules à la fin du troisième instar
- Elle est contrôlée par les morphogènes DPP dans un sens et Wingless dans l'autre
- La PCP oriente les divisions: les mutations affectant cette propriété modifie la forme de l'aile
- Des « compétitions » peuvent exister: un clone envahissant un autre moins actif

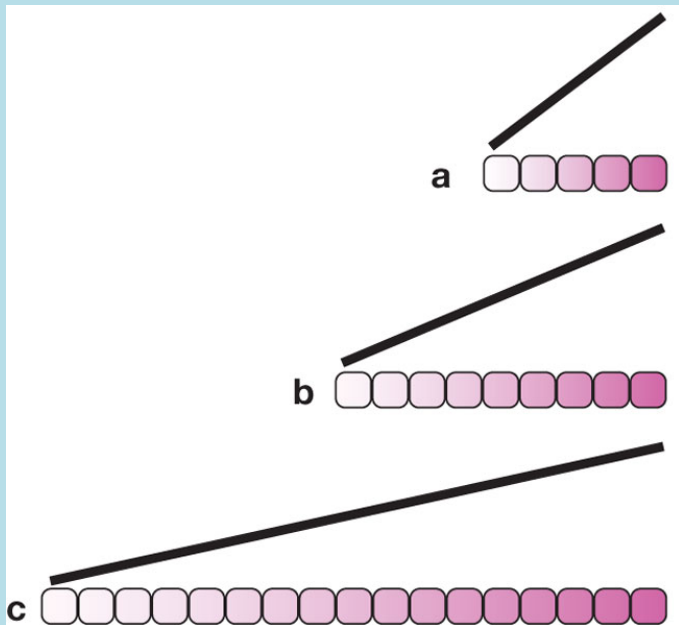
Croissance et morphogénèse (2)



- Il est possible de modifier une cellule du disque et de suivre sa descendance
- La mutation *minute* produit un clone à division plus rapide
- L'effet ne sort pas du compartiment antérieur; mais, malgré le changement dans la vitesse de division, il n'y a aucun changement morphologique
- La forme de l'aile **ne dépend pas du nombre de divisions**
- D'autres expériences (polyploidie) conduisent à la même conclusion

Croissance et morphogénèse

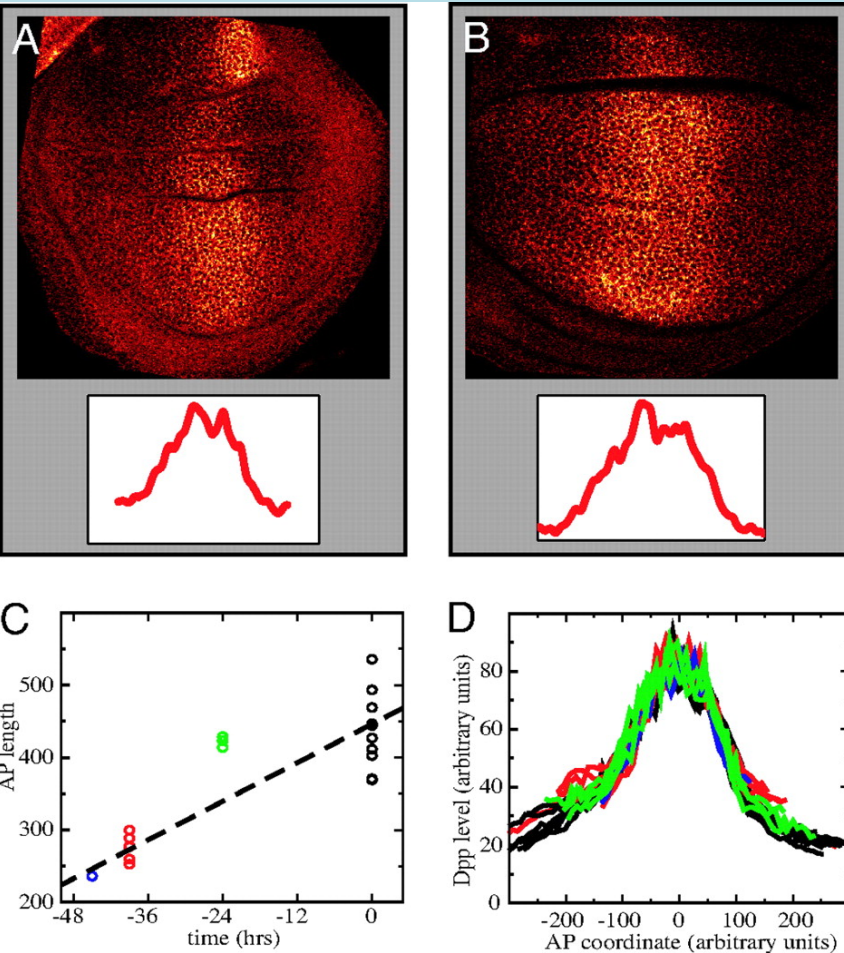
Comment s'arrête la croissance ? (1)



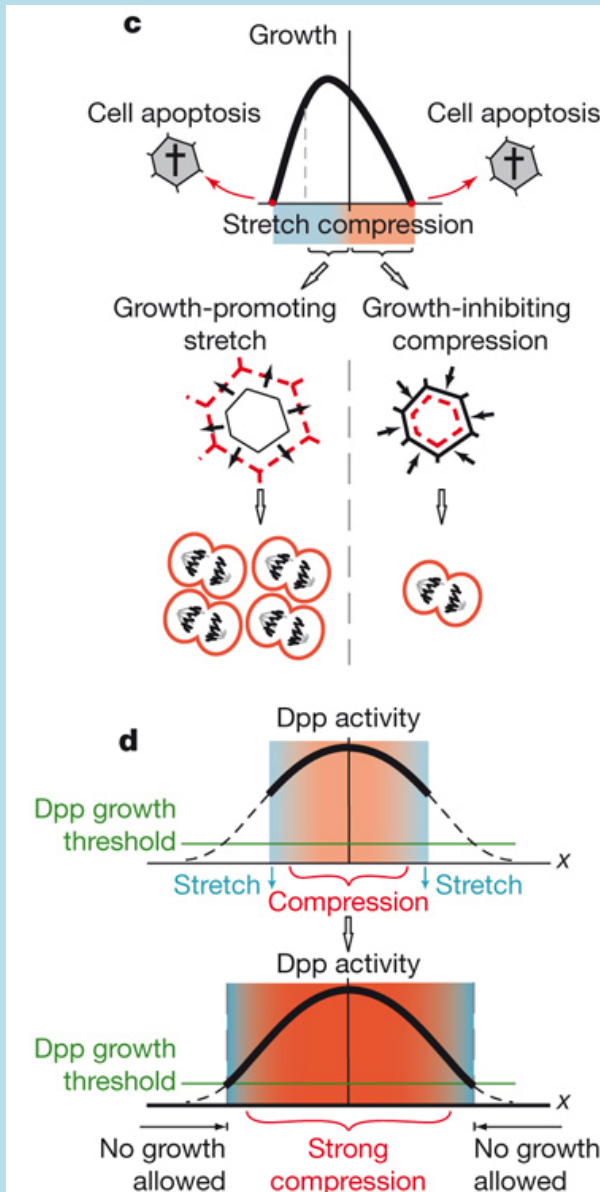
- The « Steepness hypothesis »
- 1- La décision de croissance est prise par chaque cellule
- 2- Sur chaque axe, il y a un dispositif qui sent la dimension et qui la transmet aux cellules
- 3- Ce dispositif dépend d'un gradient linéaire défini par les limites de la population
- 4- Le gradient de morphogène (Ex: DPP) établit la PCP et contrôle la croissance
- 5- Les cellules lisent la concentration et **la pente du gradient**

Comment s'arrête la croissance ? (2)

- Le modèle de Lawrence et Day est critiqué
- Le gradient de DPP-GFP a été mesuré à différents temps pour des disques de tailles différentes
- Le gradient ne s'aplatit pas avec l'âge
- On peut postuler un arrêt de croissance due à une valeur limite du morphogène
- Mais, dans l'hypothèse de Lawrence, on expliquait un arrêt coordonné de la croissance



Comment s'arrête la croissance ? (3)

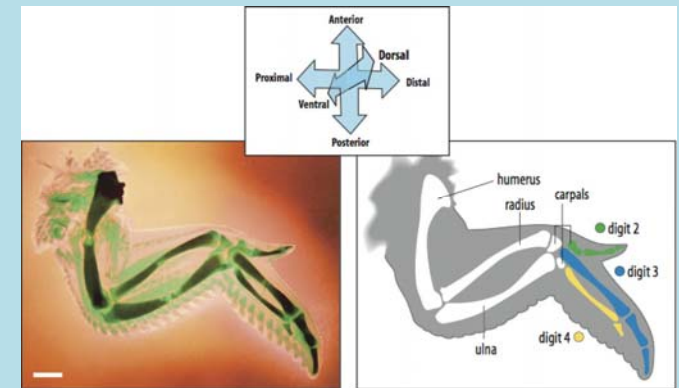
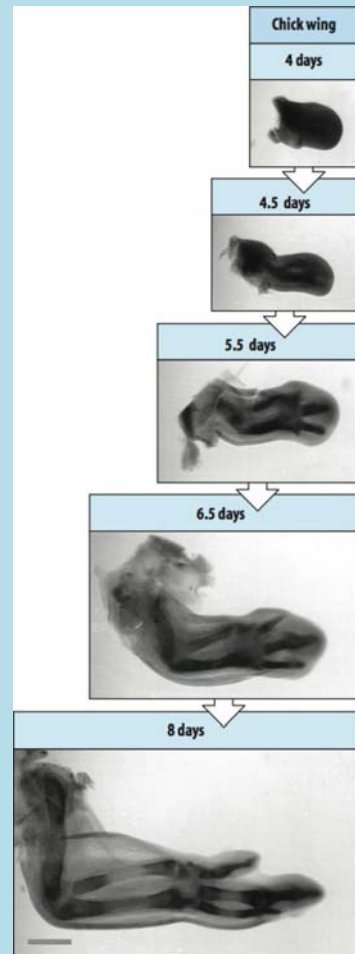
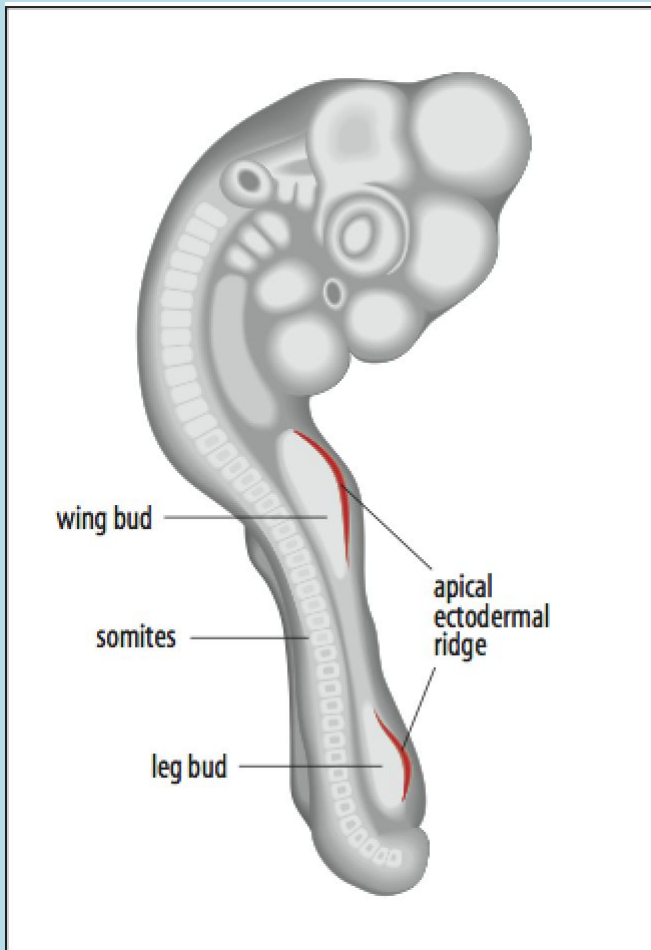


- On ajoute une hypothèse complémentaire, mécanique
- Si la croissance est reliée à la concentration de morphogène, elle sera plus rapide au centre, produisant une compression; aux bords, on aura un étirement
- La croissance est modulée par la mécanique: étirement, effet positif, compression, effet négatif
- On propose que l'arrêt de la croissance aux bords, quand la concentration de morphogène tombe sous le seuil, produise une compression au centre, arrêtant la croissance de manière concertée

Quelques mots sur le développement des membres chez les vertébrés

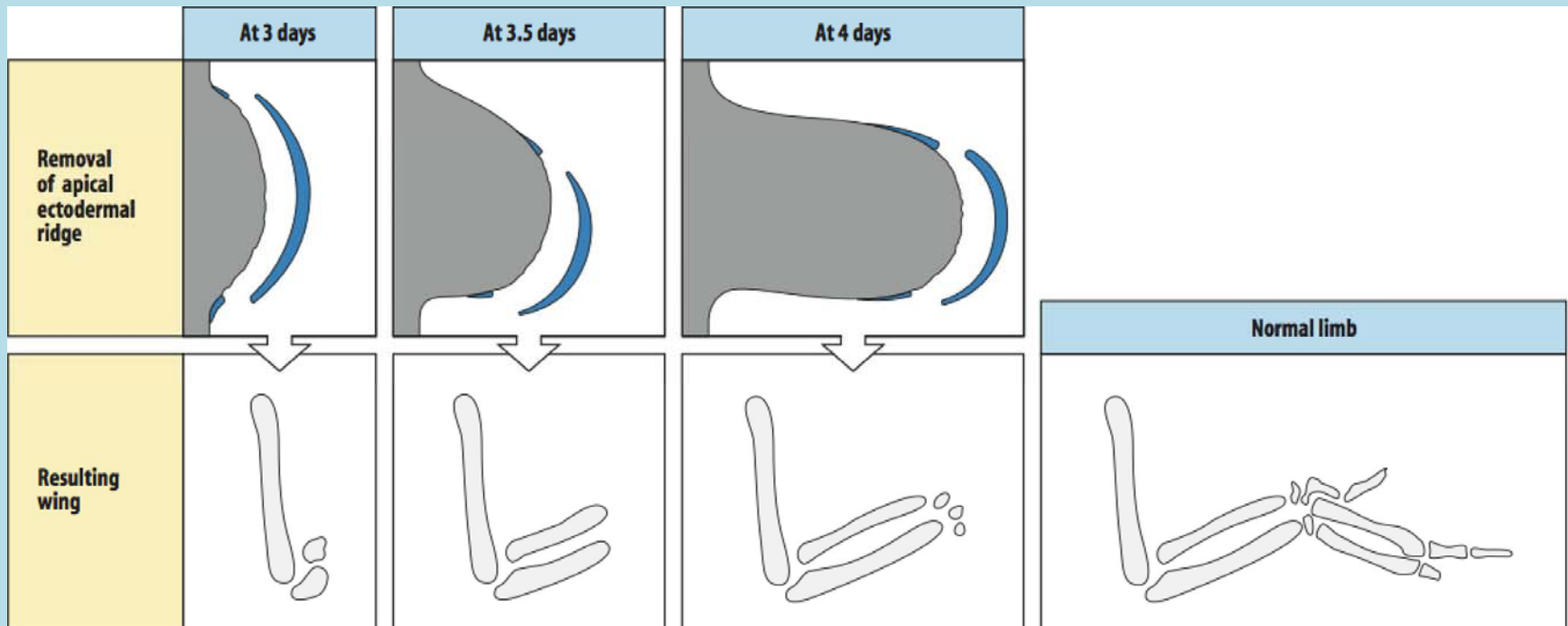
Un niveau de compréhension différent

Le développement de l'aile de poulet



- Les membres (ailes et pattes) sont organisés dans les trois axes
- Ils apparaissent très tôt (3 jours) sous la forme de bourgeons mésenchymateux

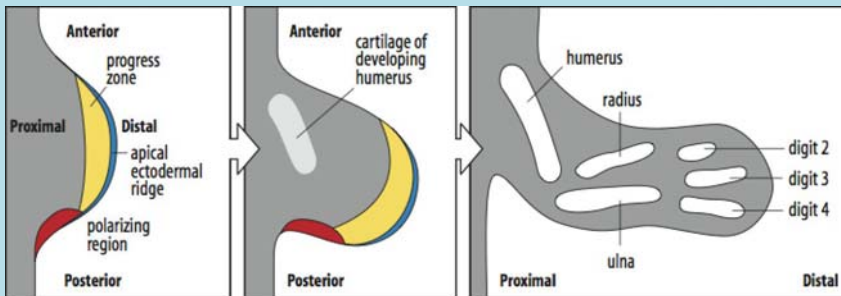
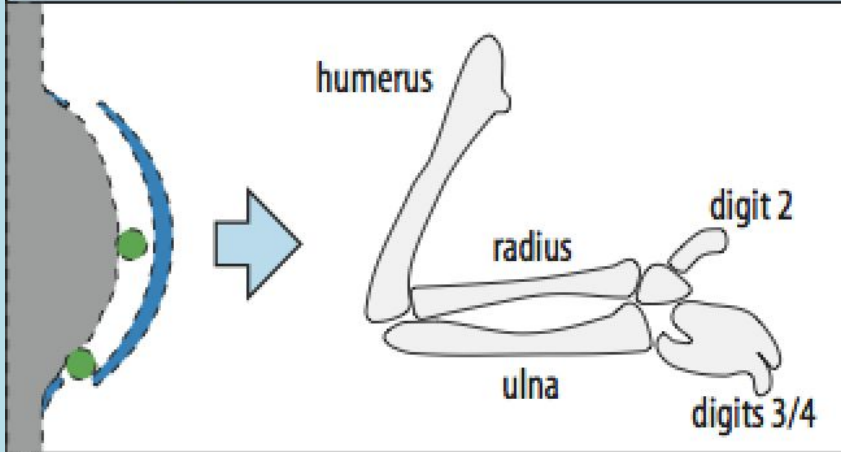
Embryologie expérimentale



- Des expériences anciennes ont montré que prélever l'épiderme recouvrant le bourgeon mésenchymateux bloquait le développement
- Selon la date de l'opération, le blocage était plus ou moins sévère
- Première théorie: la valeur positionnelle d'une cellule dépend du temps passé dans la zone progressive (distale)

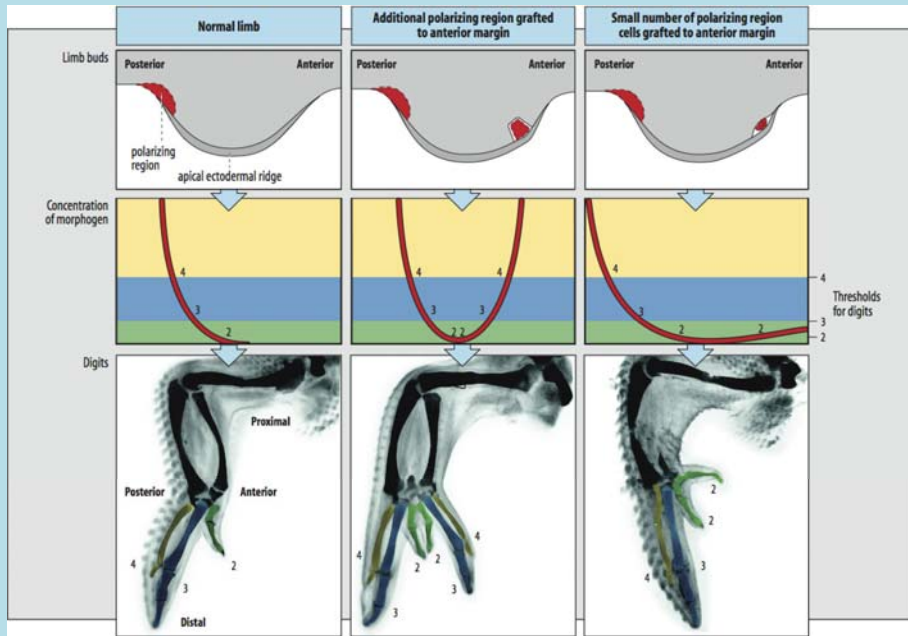
Interprétation moderne

Apical ectodermal ridge removed, followed by implantation of beads soaked in FGF-4

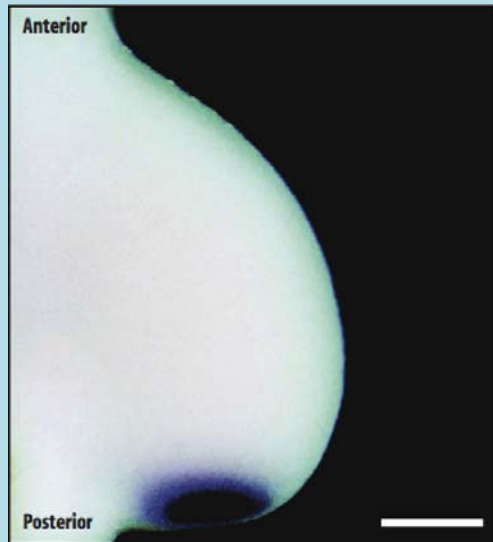


- L'effet de l'épiderme apical est remplacé par des billes imprégnées d'un facteur de développement, FGF-4
- Il y a un gradient de FGF-4 sous l'épiderme, qui maintient les cellules dans un état de prolifération et de non différenciation (progress zone)
- Une autre région est importante, située à la partie postérieure du bourgeon (rouge), la région de polarisation

Encore le drapeau français !

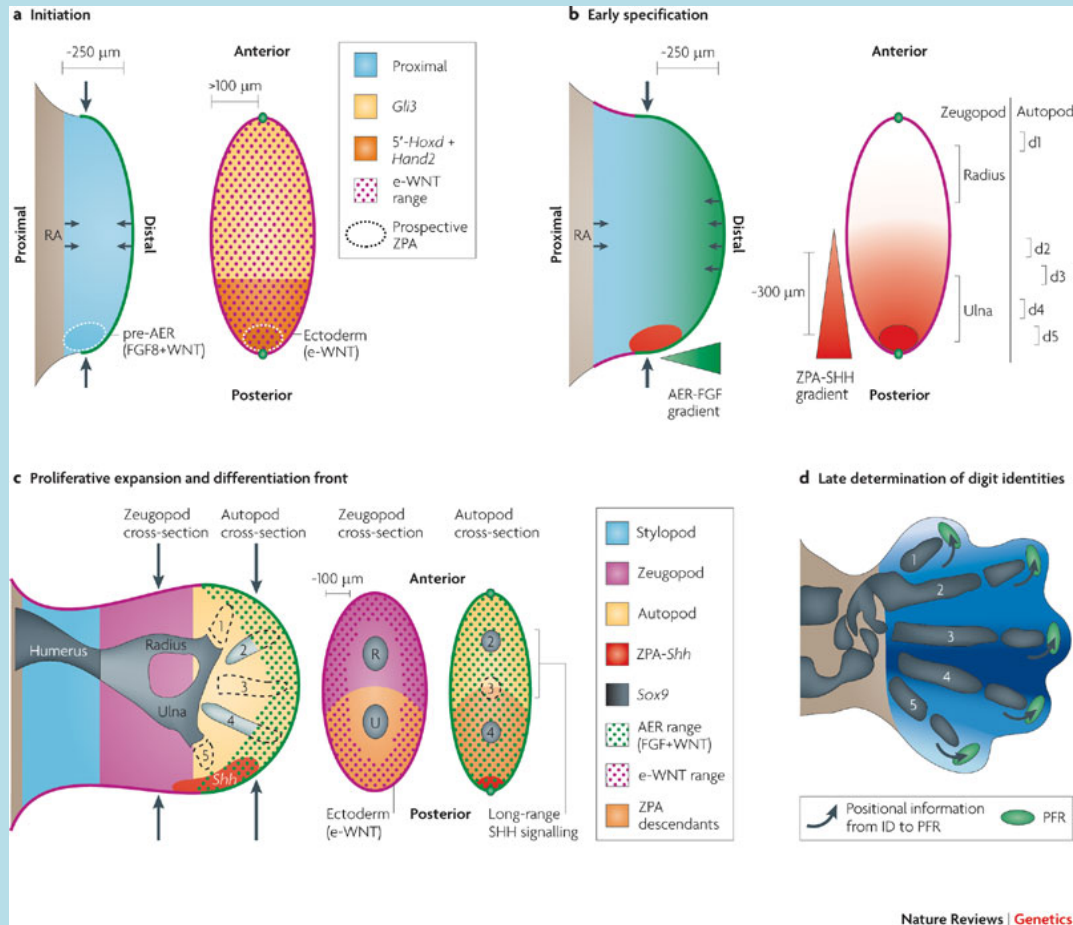


- Si on greffe une région de polarisation dans la partie antérieure du bourgeon, on observe de doigts supplémentaires, 2, 3 et 4, en miroir par rapport aux naturels
- L'interprétation est que la polarisation organise la différenciation D-V
- Cette organisation est induite par la diffusion d'une protéine SonicHedgehog, agissant comme un morphogène
- La lecture du gradient conduit à la différenciation des doigts, avec des seuils différentiels



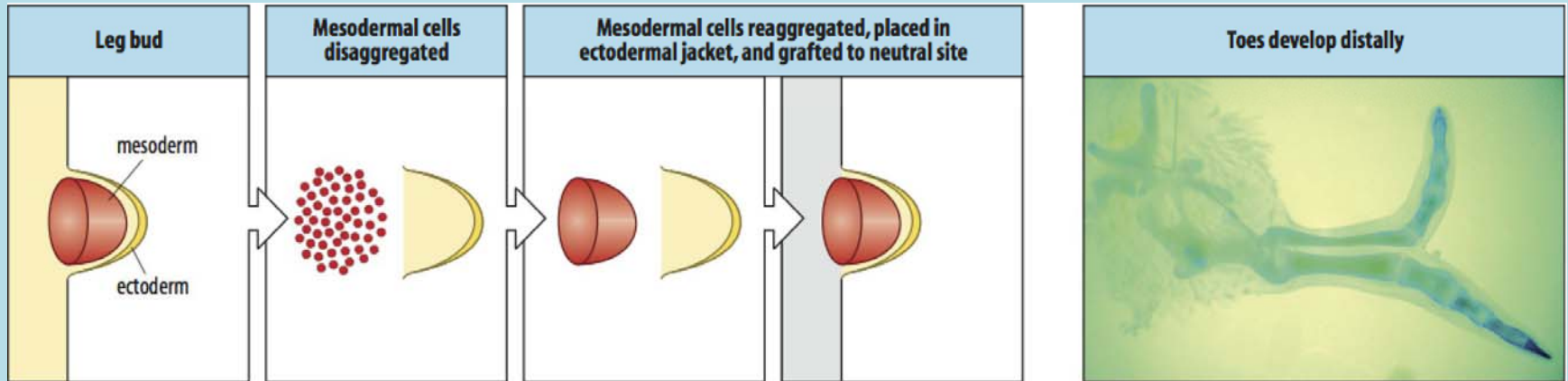
Localisation de l'ARN *sonichedgehog*

Une vision intégrée (et compliquée)



- La compréhension des effets génétiques nécessite de tenir compte des effets des gènes les uns sur les autres (boucles d'activation et de rétroaction)
 - Elle nécessite d'intégrer aussi les effets spatiaux (gradients) et temporels (horloge)
- (Zeller et al (2009) Nature Rev Genet, 10, 845)

Une surprise, pour moi ?

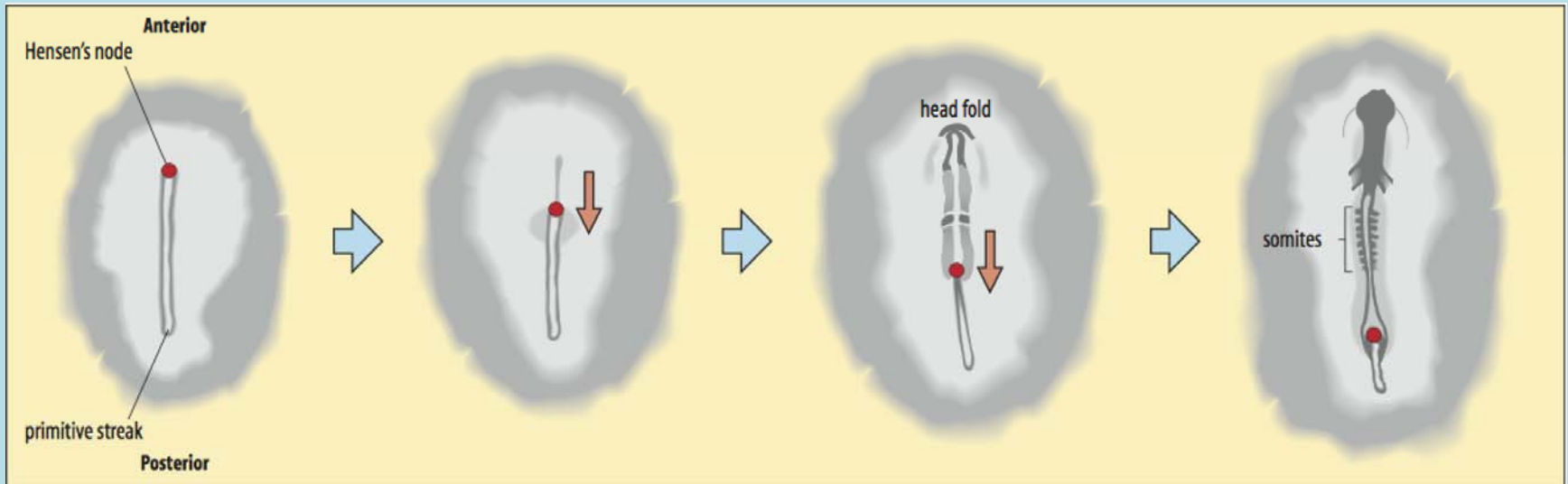


- Un bourgeon mésenchymateux est prélevé, séparé de l'ectoderme, dissocié (trypsine, centrifugation)
- L'agrégat est greffé sous l'ectoderme d'un bourgeon d'un poulet de même âge
- Le résultat est observé après 6-7 jours; dans un nombre significatif de cas, on observe un à deux doigts
- L'expérience figure dans le livre de base avec l'hypothèse de « mécanisme de réaction-diffusion »!

La somitogénèse chez le poulet

Une affaire d'horloge

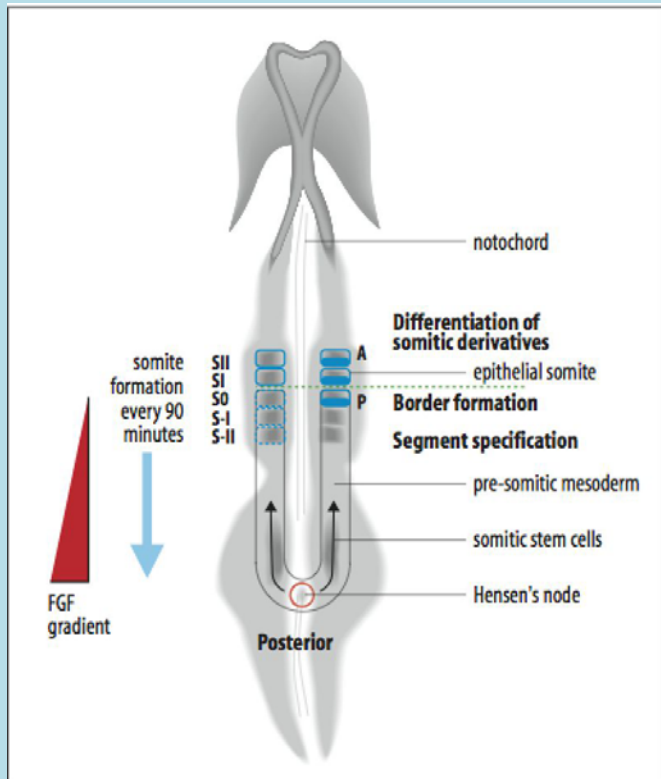
La segmentation chez le poulet



- Sur le disque de cellules, apparaît un sillon A-P (primitive streak) dont le pôle antérieur forme le nœud de Hansen, avec des vertus d' «organisateur»
- Le nœud va reculer et l'ensemble va s'allonger par apparition de cellules mésenchymateuses

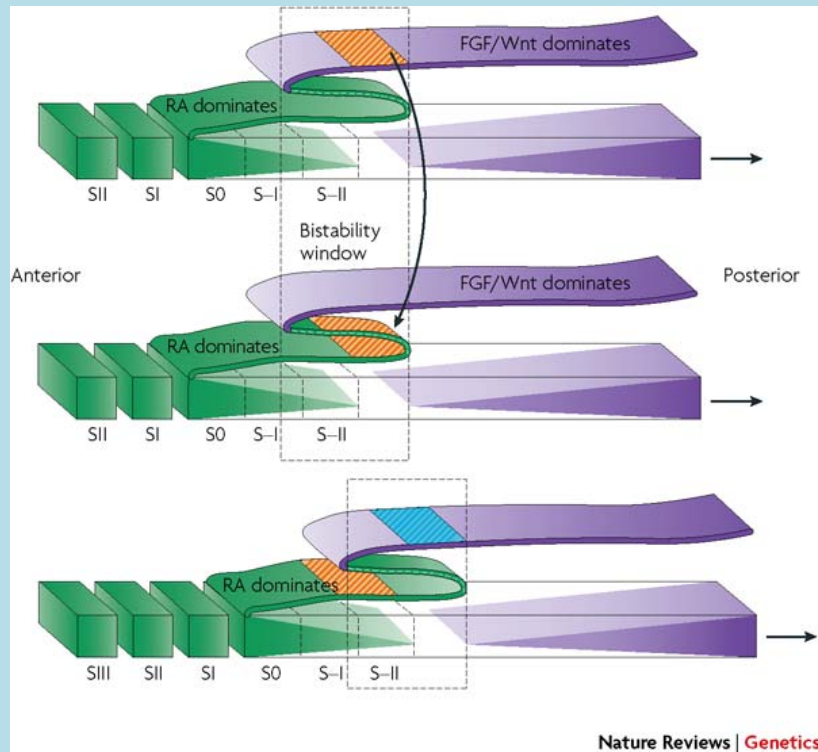
Comment s'effectue la segmentation ?

- Au stade qui nous intéresse, l'embryon va s'allonger par la croissance du mésoderme depuis l'arrière vers l'avant
- À l'arrière, il forme le mésoderme présomitique (PSM)
- Les somites, qui vont donner les vertèbres, mais aussi des nerfs, des muscles et les côtes, se forment depuis l'avant vers l'arrière
- Chez le poulet, une paire de somites toutes les 90 minutes
- Les somites sont de nature épithéliale
- La segmentation est différente de celle de la Drosophile, non progressive

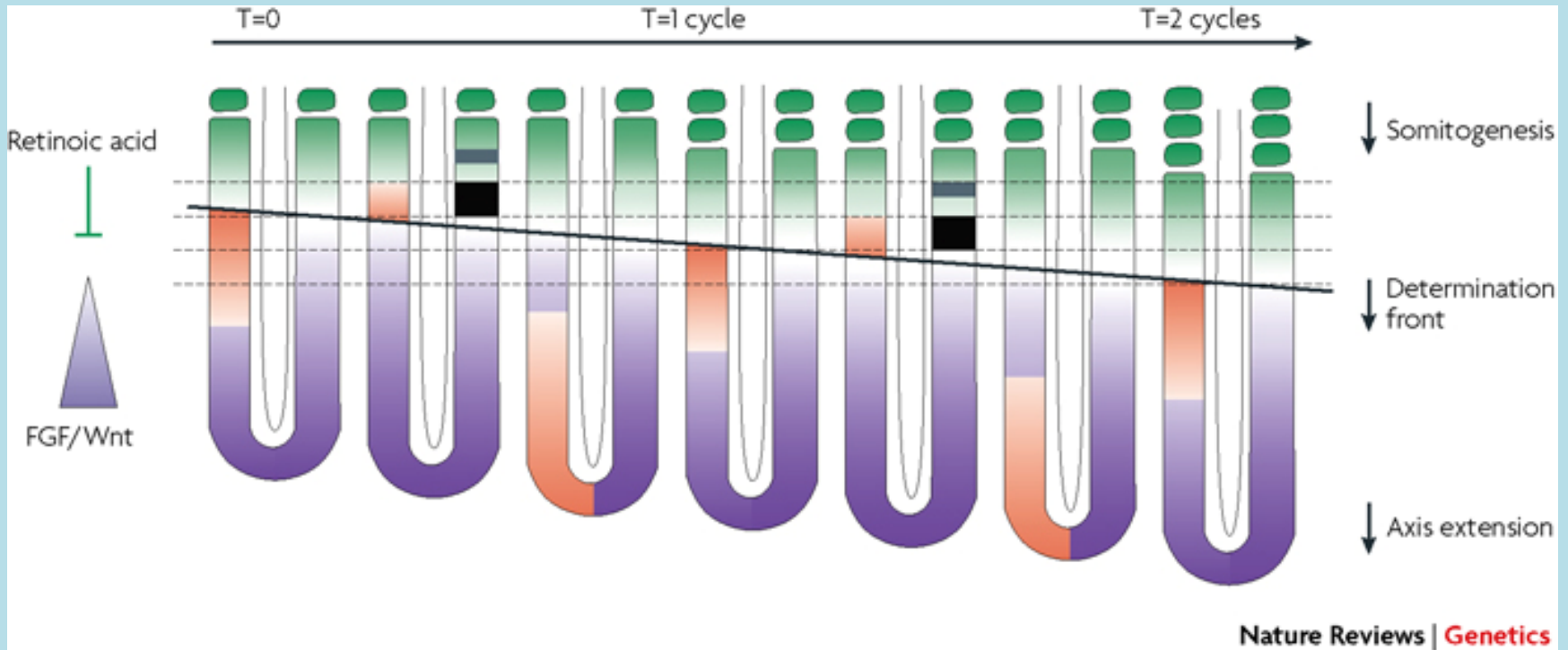


1- Des gradients opposés

- Les cellules PSM qui quittent la partie terminale (en croissance) expriment un gradient de FGF (facteur de prolifération) décroissant P->A
- Dans la partie antérieure (somite), existe un gradient inverse (A->P) d'acide rétinoïque, agent de différenciation
- Il existe une zone de rencontre des deux gradients (front de détermination); c'est une zone de bistabilité
- Une horloge va permettre le passage brutal d'un état à l'autre
- À cause de l'allongement, le gradient de FGF recule régulièrement

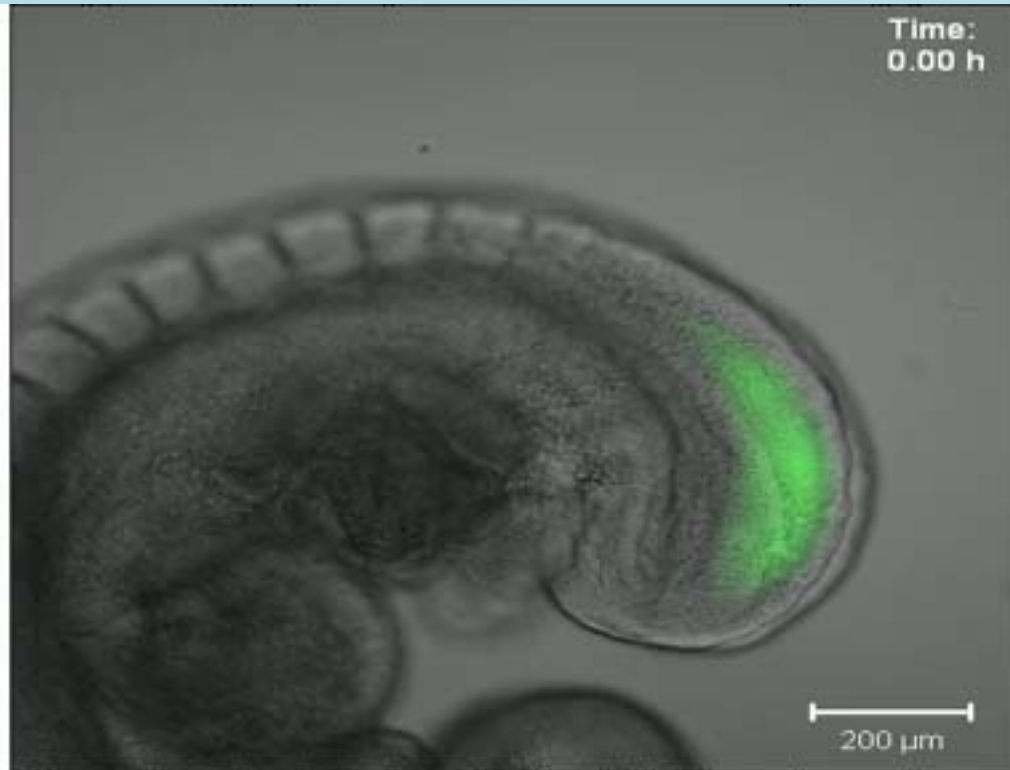


2- Une horloge génétique



- Sur la figure, les deux gradients et le front de détermination sont notés
- En orange, on voit les gènes à expression cyclique; quand des cellules franchissent le front et qu'elles sont touchées par les gènes oranges, elles deviennent somitique
- La largeur d'un somite correspond à la zone d'avancée du front entre deux passages des gènes cycliques

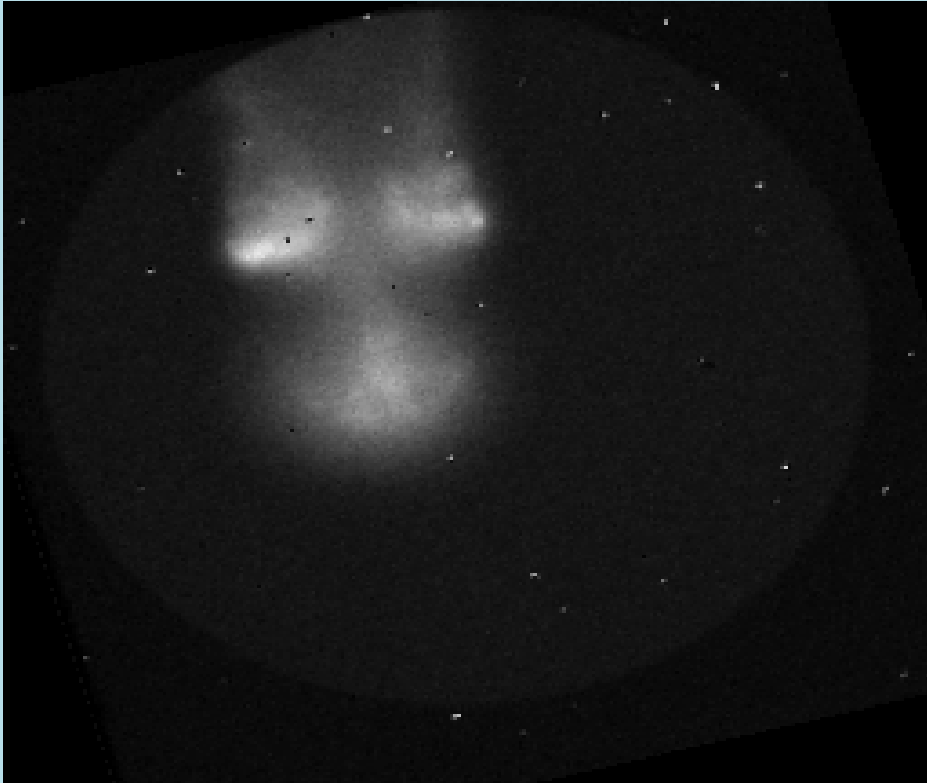
Les oscillations in vivo



- Expérience chez la souris (embryon de 9 jours)
- Protéine YFP sous le contrôle d'un promoteur de gène cyclique
- Remarquer la progression à travers le PSM, vers les somite et la formation des somites

Une autre version

- Un gène cyclique est associé avec la luciférase de luciole. On ne mesure pas la fluorescence, mais une émission de lumière en présence du substrat de la luciférase, la luciférine
- L'expérience a aussi été faite sur des fragments de PSM: la bioluminescence est en phase à l'intérieur des fragments
- Avec des cellules dissociées, on observe aussi des oscillations (en cellule unique), mais avec des phases et amplitudes variables
- La communication cellulaire est nécessaire pour la synchronie (Notch)



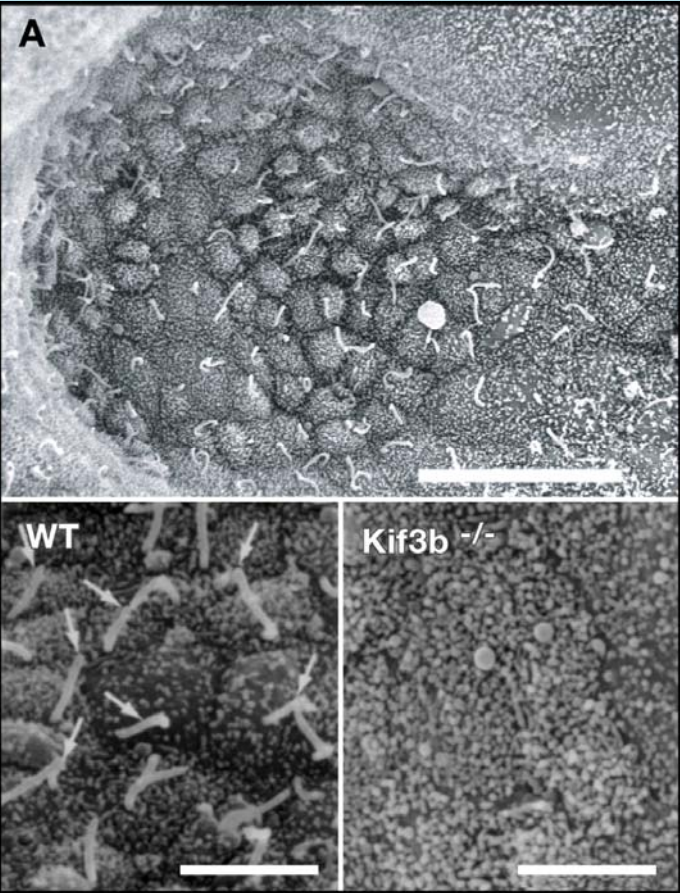
(Masamizu et al (2006) PNAS, 103, 1313)

L'asymétrie Gauche-Droite

Pour un battement de cil

L'asymétrie G-D chez la souris

Barre: 20 et 5 μm

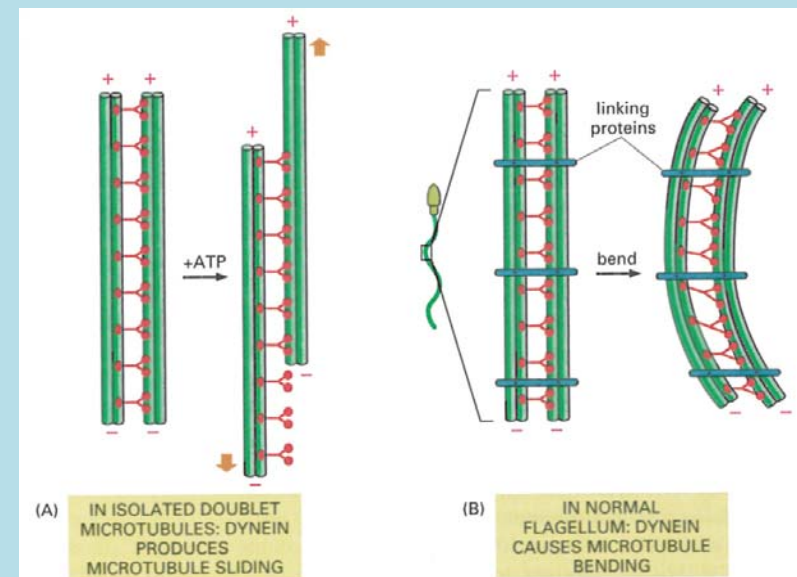
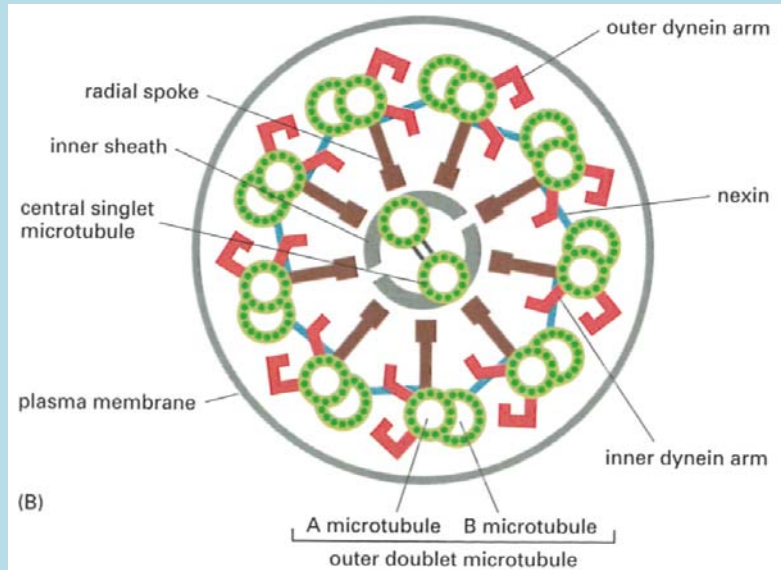


(Hirokawa et al (2006) *Cell*, **125**, 33)

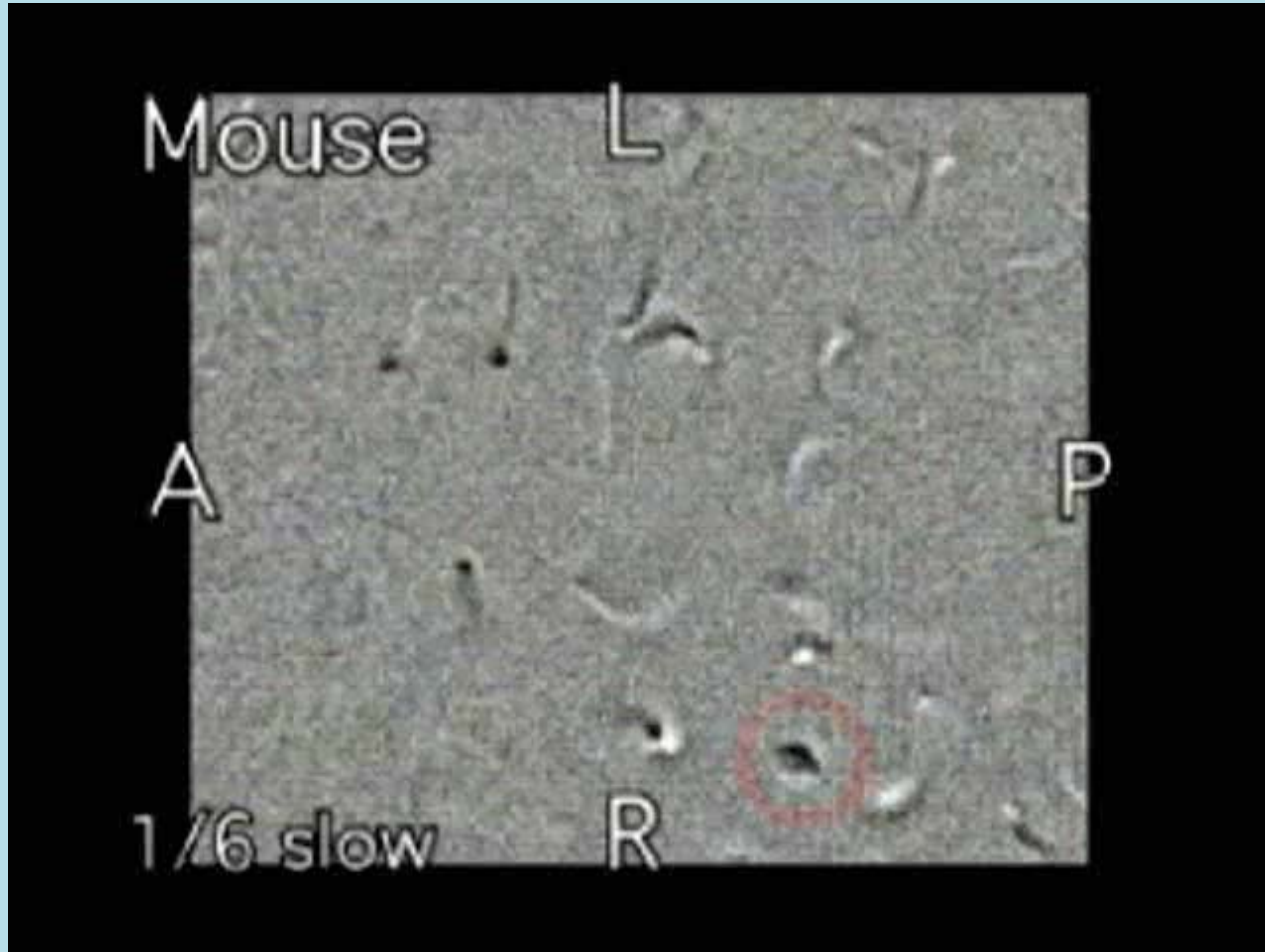
- Le syndrome de Kartagener correspond à des individus (50%) dont les organes sont dans l'orientation inverse; ils ont aussi des ciliopathies (sperme, épithé. bronchique)
- Chez la souris, la mutation KIF3 (kinésine) donne des troubles nombreux dont une misorientation des organes, chez 50% des animaux
- Des études préalables pointaient sur un rôle d'une structure embryonnaire transitoire, dans la ligne primitive (axe A-P dorsal), le nœud
- Le nœud comporte des cellules monociliées; chez le mutant, pas de cils

Cils et flagelles

- Ils comportent une couronne de 9 doublets de tubuline, solidarisés
- Chaque doublet lie un moteur (dynéine) capable en présence d'ATP de glisser sur le doublet voisin
- La mécanique impose une déformation qui, de manière concertée, produit une rotation
- La chiralité du système autorise uniquement les rotations dans le sens horaire
- La rotation est rapide: 600 t/min

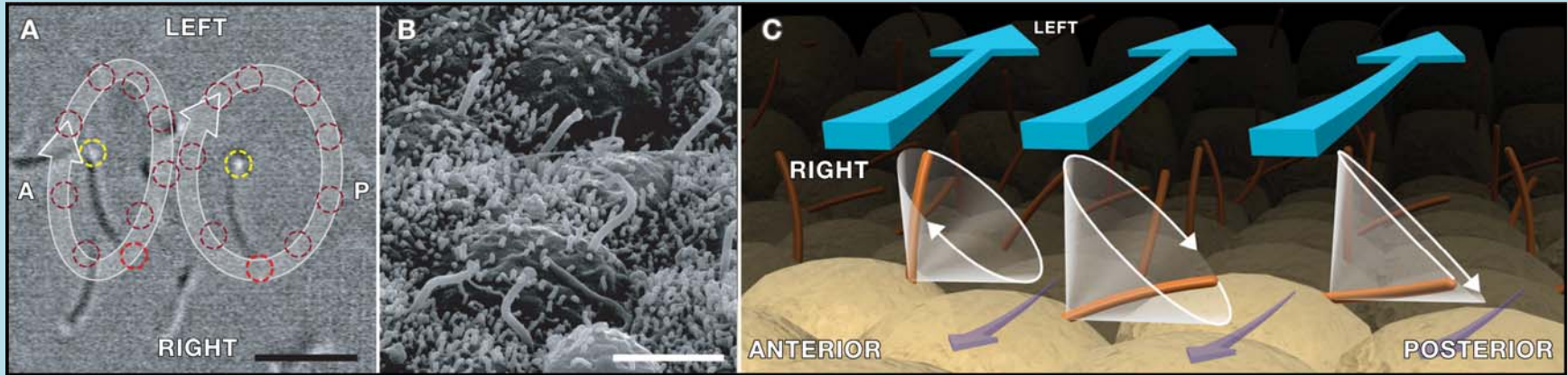


La rotation du cil produit un flux orienté (1)



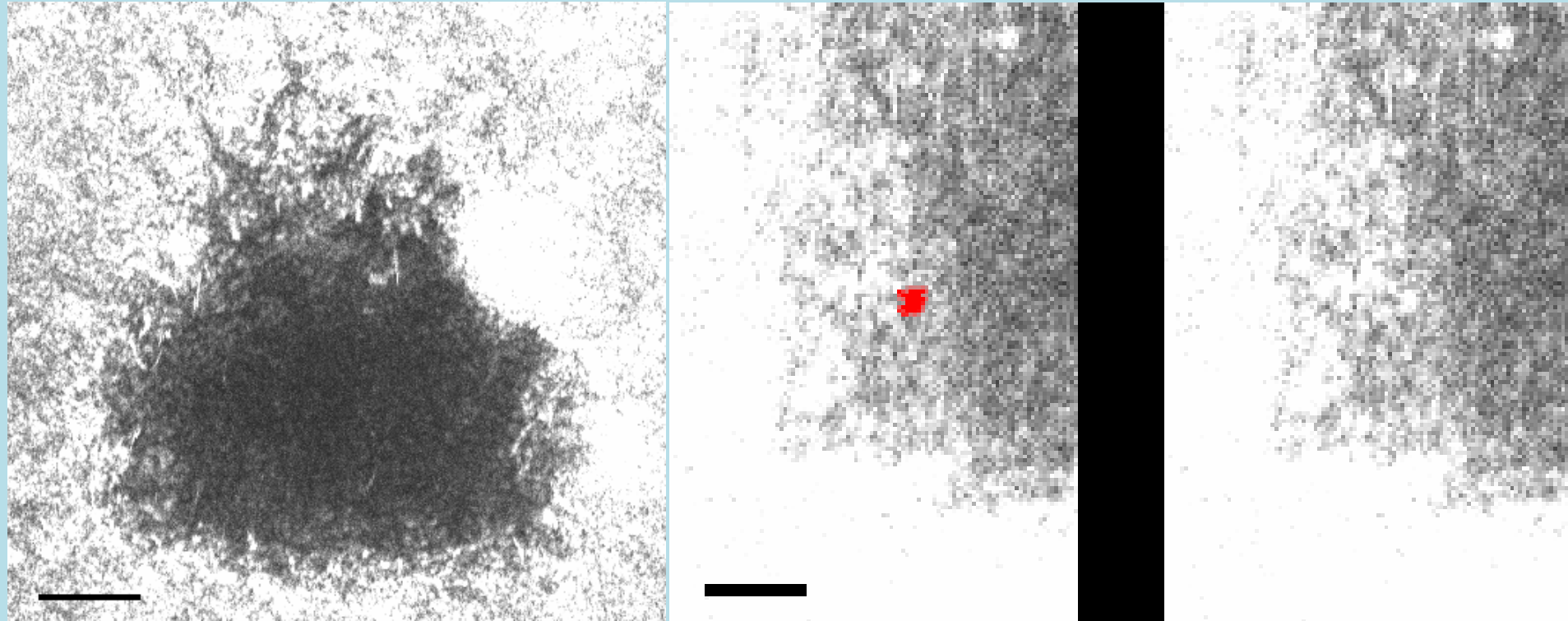
- La rotation des cils à l'intérieur de la cupule correspondant au nœud produit un flux orienté vers la gauche

La rotation du cil produit un flux orienté (1)



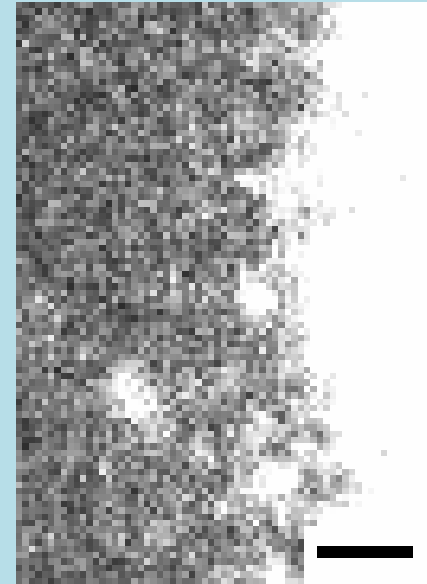
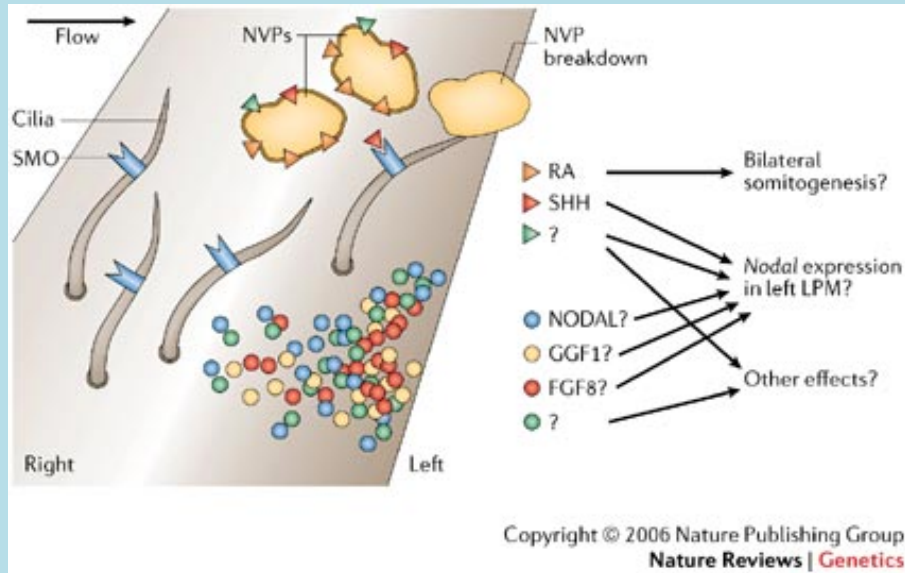
- Plusieurs phénomènes permettent ce flux:
- Le cil est implanté sur une surface courbe, à l'arrière
- L'axe de rotation est incliné de $40 \pm 10^\circ$ vers l'arrière
- À cause du faible nombre de Reynolds, le déplacement vers la droite, à proximité de la cellules est moins efficace

Le flux nodal biaise la distribution de morphogène (1)



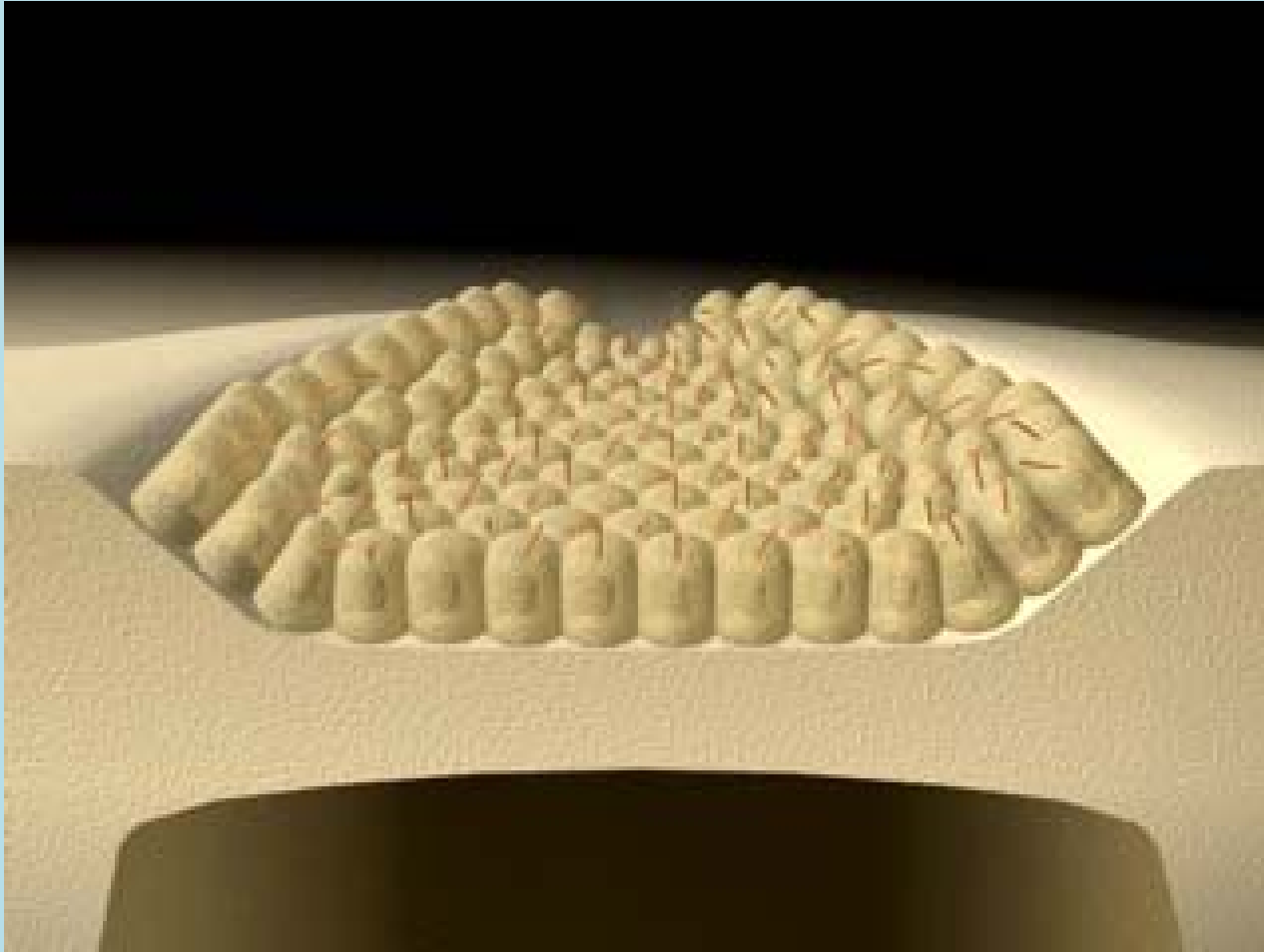
- Antérieur, en haut, postérieur, en bas, marquage des membranes par un colorant lipophile
- À gauche, flux vers la gauche (à droite sur la vidéo) de particules $\approx 1\mu\text{m}$, avec membrane: NVP, Nodal Vesicle Parcel
- À droite, éjection d'un NVP

Le flux nodal biaise la distribution de morphogène (2)



- Les NVP contiennent différents morphogènes
- À la périphérie du nœud, il y a des cils immobiles, portant des récepteurs pour les morphogènes
- Au contact de ces cils, les NVP se désintègrent et on a une activation sélective des récepteurs du côté gauche

Le scénario



Que retenir de tout ça ?

- Parmi les acteurs importants, les facteurs de transcription et la signalisation permettent aux cellules d'acquérir une identité
- La notion de morphogène et l'hypothèse du drapeau français sont une première base d'organisation spatiale
- La notion d'horloge et l'organisation temporelle restent à explorer
- Les facteurs physiques (mécaniques) et leur origine biologique sont certainement sous-estimés
- La biologie du développement est un des champs les plus dynamiques de la biologie et il est ouvert à la physique

Quelques remerciements

- Certains collègues, plus spécialisés, m'ont aidé à acquérir ma science toute neuve:
 - Antoine Guichet, à l'Institut Jacques Monod
 - Emmanuel Farge, à l'Institut Curie
 - YohannsBellaiche, aussi à l'Institut Curie
- Ce travail m'a aussi permis de voir que nos collègues français jouent un rôle important dans ce champ thématique: Olivier Pourquoié (Strasbourg), Thomas Lecuit (Marseille)... et qu'ils n'hésitent pas à travailler avec des physiciens