

Université  
de Liège



**FACULTE DES SCIENCES**  
*Département des Sciences de la Vie*  
Bac2 – Sciences biologiques

# **INTRODUCTION A L'EMBRYOLOGIE ANIMALE**

**BIOL-0019-1**

Vincent GEENEN

2015

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

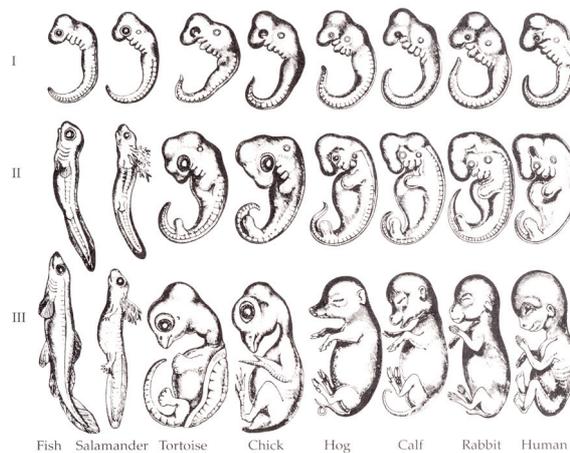
- I. Mécanismes de différenciation cellulaire :  
Communication cellulaire, facteurs de transcription et gènes homéotiques
- II. Biotechnologies et embryologie
- III. Gamétogenèse : ovogenèse et spermatogenèse
- IV. Fécondation : la formation de l'embryon
- V. Segmentation précoce et implantation de l'embryon
- VI. Plan de base de l'embryon : la gastrulation et l'induction du mésoderme
- VII. Placenta et membranes extra-embryonnaires
- VIII. Développement de l'ectoderme, du mésoderme et de l'endoderme
- IX. Un modèle de différenciation cellulaire :  
différenciation thymique et éducation au soi des lymphocytes T
- X. Développement normal et oncogenèse
- XI. Les cellules souches embryonnaires

## ***Introduction***

Comment l'œuf fécondé produit-il, en se développant, un être nouveau ? Mystère banal, quotidien, qui sous-tend l'ensemble du cours d'embryologie. La genèse d'un être ne comporte pas exclusivement des procédés de multiplication et de croissance cellulaires. Peu à peu, les cellules en viennent à se différencier les unes des autres. « *Pénétrer les causes de cette différenciation sera l'une des grandes tâches de l'embryologiste et de l'embryologie moderne* » (Jean Rostand, 1965). Par sa définition même, l'embryologie se situe donc dans la continuité directe des cours de biologie et de cytologie. Au-delà de la cellule, l'embryologie va s'intéresser en premier lieu à la sociologie de celle-ci, aux rapports qu'elle noue avec son environnement et avec ses autres partenaires dans l'édification de l'organisme. La majeure partie de ce cours est consacrée à ce que l'on nomme aujourd'hui la *biologie du développement*. Non seulement, l'étude de celle-ci a permis de mieux comprendre les phénomènes de la régénération tissulaire, de la croissance et du vieillissement, mais aussi la question du cancer qui peut être abordée comme un processus de développement anormal. De même, une anomalie de la différenciation, un trouble de l'éducation au soi des lymphocytes T (thymo-dépendants) joue un rôle fondamental dans l'étiologie de maladies auto-immunes dévastatrices comme le diabète de type 1 ou insulino-dépendant, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies de la thyroïde...

Chez les vertébrés, les embryons se ressemblent bien davantage que les adultes: la spécialisation est en effet toujours plus marquée chez les adultes que chez les jeunes. Ce phénomène d'un tronc commun du développement embryonnaire précoce est susceptible d'une interprétation qui a ouvert de vastes aperçus dans le domaine de l'évolution. Elle a été fournie dès 1628 par William Harvey, et développée ensuite à plusieurs reprises tant par les adversaires de Charles Darwin comme Karl Ernst von Baer que par ses ardents partisans comme Ernst Haeckel. Ce dernier l'a exprimée sous forme d'une loi, dite *loi de biogénétique fondamentale*, et résumée en une formule saisissante : « *L'ontogénie reconstitue la phylogénie* ». L'ontogénie, c'est le

développement embryonnaire de l'individu à partir de l'œuf, tandis que la phylogénie désigne l'évolution d'un groupe animal dans le temps, autrement dit, la succession de ses ancêtres. Selon Haeckel, l'embryon traverse successivement les différentes étapes adultes de ses ancêtres, de telle sorte que l'étude du développement embryonnaire humain peut révéler l'évolution des animaux. L'embryologie est redevable à cette loi ou à ce principe d'une grande partie des connaissances acquises sur le développement depuis la fin du siècle dernier. Parmi les exemples qui l'illustrent le mieux, on notera les arcs et des sillons branchiaux de l'embryon des mammifères qui rappellent les fentes branchiales des poissons, ou encore le système nerveux précoce de l'embryon de mammifères semblable à celui de l'amphioxus.



*Dessins d'Haeckel du développement embryonnaire de différentes espèces*

Ce principe a donc été très utile, mais il n'explique pas tout ! Il faut le réduire à la constatation d'un fait réel, à savoir la répétition des phénomènes de développement dans un même groupe, indice d'une parenté certaine entre les organismes qui le composent. L'embryologie moderne et moléculaire a fourni la possibilité d'une explication de cette répétition : elle a établi avec précision l'architecture générale des œufs, dressant leurs plans d'ébauches, permettant de situer les différents territoires au niveau de l'œuf fécondé. Bien plus que par l'étude des *homologies* (caractéristiques de l'anatomie et de la biochimie comparées), l'embryologie contemporaine se caractérise par la démonstration d'*analogies* fonctionnelles. Pour employer une métaphore fréquente, il semble que la nature ait à sa disposition peu de mécanismes différents, mais qu'elle les utilise en les variant à l'infini. Comme l'a écrit à juste titre François

Jacob, la nature a fait preuve dans son évolution de talents dignes d'un bricoleur de génie ! Cette répétition des mécanismes fondamentaux démontre bien l'unité des formes vivantes, au-delà de leur extrême diversité et de leur complexité croissante.

Depuis une dizaine d'années, la biologie du développement vit un véritable essor lié principalement à l'introduction de techniques sophistiquées en génétique. La possibilité d'introduire ou d'inactiver certains gènes dans l'embryon, d'activer certains gènes dans une population cellulaire spécifique nous a permis d'accomplir des progrès considérables dans la compréhension du phénomène vivant. En cherchant à forcer les mystères de celui-ci, l'homme a progressivement conquis le pouvoir de manipuler son patrimoine génétique. Ce constat soulève évidemment d'importantes questions éthiques que l'homme devra avoir le courage d'affronter et d'essayer de résoudre.

Vincent GEENEN  
*Directeur de Recherches au FNRS  
Centre d'Immunologie de l'ULg*

#### **Ouvrages de référence**

*Biologie du développement : les grands principes.*  
Lewis Wolpert (1998)  
Dunod, Paris  
ISBN 2-10-004189-4

*Developmental Biology, 6th Edition*  
Scott F. Gilbert (2000)  
Sinauer Associates, Sunderland MA, USA  
ISBN 0-87893-243-7

***I. Différenciation et diversité cellulaires –  
Communication cellulaire et édification du Soi -  
Les gènes à homéoboîte.***

Comme nous l'avons répété à plusieurs reprises depuis le début de ce cours, la compréhension des mécanismes intimes intervenant dans la différenciation cellulaire demeure un des enjeux fondamentaux de l'embryologie moderne. Malgré l'extraordinaire diversité cellulaire issue de l'œuf unique fécondé, quelques grands principes généraux semblent avoir été utilisés à profusion pour assurer cette progression dans la complexité.

**I. La grammaire de la communication cellulaire - Théorie de l'information**  
(Fig. I.1-5)

Nous avons vu précédemment qu'un mécanisme important impliqué dans la détermination cellulaire était constitué par le jeu des communications chimiques entre les cellules de territoires différents. Les cellules de l'organisme communiquent entre elles. Dès 1905, E. Starling inventait le terme d'*hormone* (messager chimique) pour désigner les substances permettant aux différents organes d'être reliés entre eux. Vers la même époque, le terme de *récepteur* apparaissait d'une part sous la plume de J. Langley, pour expliquer les processus de transmission de l'influx nerveux dans les synapses, et d'autre part sous celle de P. Ehrlich, pour rendre compte de l'action des médicaments.

Signaux chimiques, récepteurs, code, seconds messagers et bien d'autres termes empruntés au répertoire de la théorie de l'information font désormais partie du vocabulaire de la biologie. Ils traduisent le pouvoir d'intégration des organismes, c'est-à-dire leur aptitude à vivre et à se développer comme un tout dont les parties sont solidaires, grâce aux messages qu'échangent continuellement les cellules. Un schéma général de l'évolution de la communication cellulaire est donné à la Figure I.5. La cellule qui se parle à elle-même constitue le stade le plus primitif (communication *autocrine*) et se retrouve aussi dans certains phénomènes néoplasiques. A la suite de la première division de l'œuf, il en résulte deux cellules filles qui peuvent communiquer entre elles via des molécules d'*adhésion* (Fig. I.3-4). La communication *paracrine* implique des échanges de signaux entre des cellules situées au sein d'un même tissu ou

d'un même organe. A un stade primitif intermédiaire entre l'adhésion cellulaire et la communication paracrine, la communication *cryptocrine* est une forme d'interaction paracrine au sein de microenvironnements spécialisés où des populations cellulaires migrent et viennent se différencier au contact de grandes cellules épithéliales « nourrices ». Comme nous le verrons plus loin, cette forme de communication cellulaire est associée dans le thymus à la présentation du Soi au système immunitaire encore immature. La communication (*neuro*)*endocrine* nécessite le transport des signaux hormonaux à partir de cellules endocrines ou de cellules neurosécrétrices via le courant sanguin vers des cellules cibles situées à distance et qui les reconnaissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Au sein du système nerveux central, le réseau des *synapses* sert de support à l'échange de neurotransmetteurs et a permis l'émergence des fonctions centrales supérieures et cognitives comme le langage, système de communication et de reconnaissance à l'échelle du groupe humain.

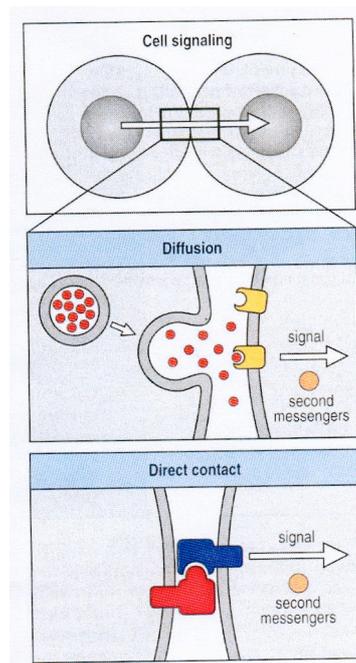


Fig. I.1 – *Communication cellulaire*

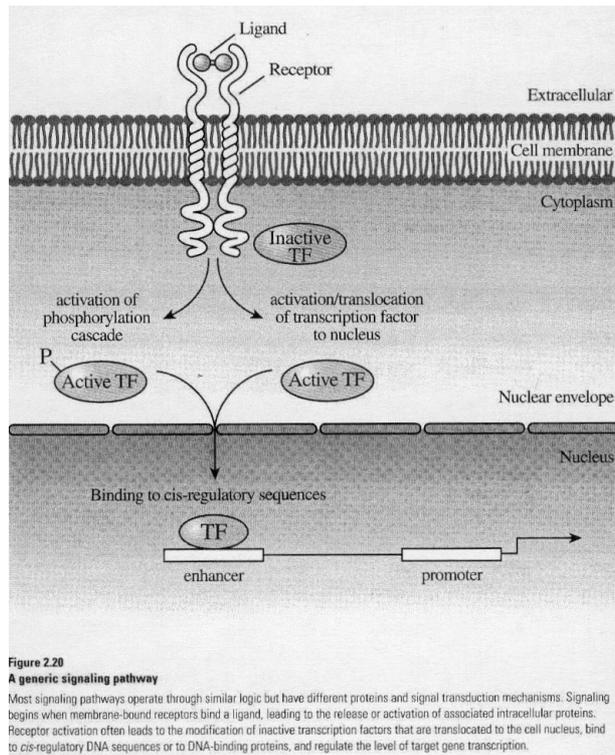


Fig. I.2 – *Modèle générique de l'information avec signal (ligand peptidique), réception et transduction en signalisation intracellulaire.*

Dans le cas d'un ligand/signal de nature stéroïde, les récepteurs (R) sont localisés dans le cytosol de la cellule réceptrice. C'est le complexe ligand/R qui migre alors dans le noyau et qui interagit directement avec un site de liaison spécifique à l'ADN. On parle alors de récepteurs nucléaires. Récepteurs stéroïdiens : GR (R aux glucocorticoïdes), ER (R aux œstrogènes), PR (R à la progestérone), RAR (R à l'acide rétinoïque). Les R aux hormones thyroïdiennes sont aussi des R nucléaires.

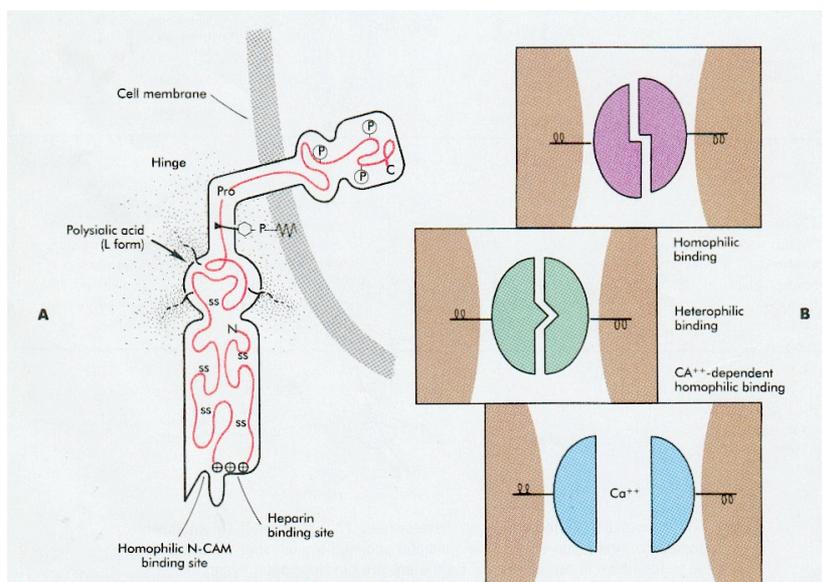


Fig. I.3 – *Structure et types de relations entre molécules d'adhésion cellulaire.*

TABLE 4-1 Cell Adhesion Molecules			
MOLECULE	BINDING MECHANISM	ION DEPENDENCE	TISSUE DISTRIBUTION
<i>N</i> -CAM (D <sub>2</sub> , BSP-2)	Homophilic*	Ca <sup>++</sup> independent	<i>Early</i> : Epiblast, neural plate and tube, placodes, mesoderm <i>Late</i> : Nervous system, skeletal muscle (motor end plate), cardiac muscle, smooth muscle, adrenal cortex, gonads, renal epithelia, spleen, gut, mesenteries
Ng-CAM (L1, NILE)	Heterophilic†	Ca <sup>++</sup> independent	<i>Late</i> : Neurons and glial cells
<i>L</i> -CAM (E-cadherin, uvomorulin, Cell CAM 120/80, Arc-1)	Homophilic	Ca <sup>++</sup> dependent	<i>Early</i> : Inner cell mass, trophoblast <i>Late</i> : Nonneural ectoderm, urogenital epithelium (mesonephric duct, paramesonephric duct), epithelia of gut (liver, pancreas), respiratory epithelia, pharyngeal glands
<i>N</i> -cadherin (A-CAM, C-Cal-CAM)	Homophilic	Ca <sup>++</sup> dependent	<i>Early</i> : Mesoderm, notochord <i>Late</i> : Nervous system, lens, striated muscle, primordial germ cells, renal primordia
<i>P</i> -cadherin	Homophilic	Ca <sup>++</sup> dependent	<i>Early</i> : Extraembryonic ectoderm, endoderm, notochord, lateral plate mesoderm <i>Late</i> : Epidermis, pigment layer of retina, placenta

Data from Edelman GM: *Annu Rev Cell Biol* 2:81-116, 1986; and Takeichi M: *Development* 102:639-655, 1988.  
\*Homophilic: binding to cells of the same type.  
†Heterophilic: binding to cells of a different type.

Fig. I.4 – Distribution intra-embryonnaire des molécules d'adhésion.

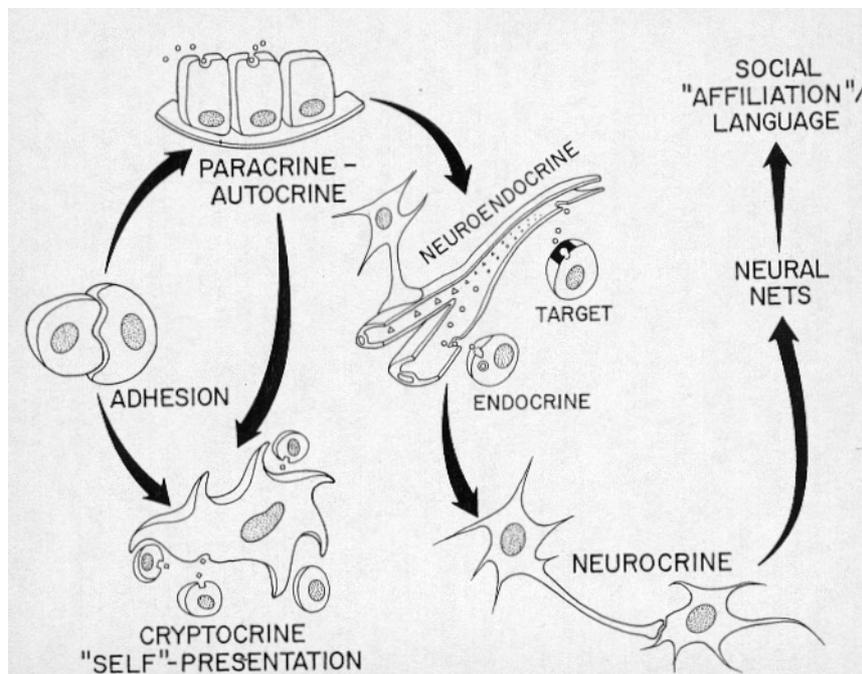


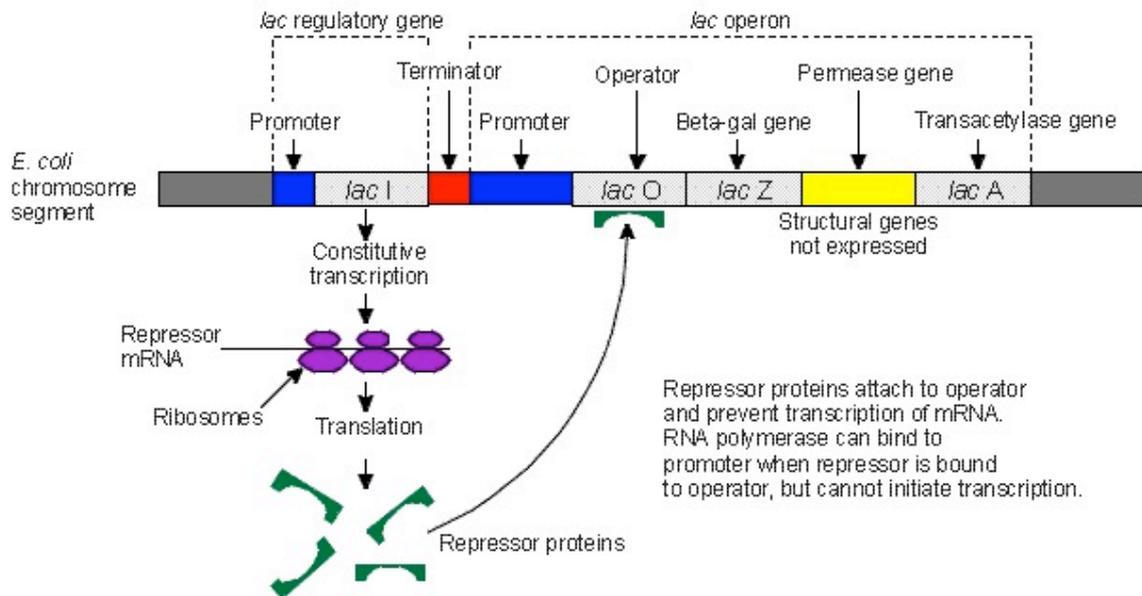
Fig. I.5 – Evolution de la communication cellulaire  
(Geenen V. et coll., *Prog. NeuroEndocrinImmunol.*, 1991, 4 : 135-142)

## II. Le contrôle de l'expression des gènes : les facteurs de transcription

Les cellules conservent tous les gènes présents dans l'œuf et possèdent un moyen de contrôler l'expression de ces gènes, c'est-à-dire la synthèse des protéines dont ils renferment le code. Si l'on compare le génome à un grand livre dont chaque page serait un gène, cela revient à dire que toutes les cellules d'un organisme, depuis l'œuf jusqu'à l'adulte, disposent du même livre. C'est le mode de lecture du livre qui est strictement contrôlé, de sorte que quelques pages seulement sont lisibles dans chaque cellule. Les agents de ce contrôle sont des protéines régulatrices appelées des *facteurs de transcription*, capables de se lier à l'ADN, sur des séquences de nucléotides spécifiques, et de bloquer ou de favoriser l'expression de ces gènes en fonction des besoins de la cellule. Ces protéines sont elles-mêmes codées par des gènes, dits gènes régulateurs, eux aussi plus ou moins actifs d'une cellule à l'autre. On estime généralement qu'environ 5 à 10% du génome humain pourraient être des gènes régulateurs. Pour exemple, on parle beaucoup aujourd'hui de l'altération du gène codant pour la protéine *p53*, qui est le caractère génétique le plus fréquemment associé au cancer humain; or la *p53* est précisément une protéine régulatrice dont un gène cible contrôle les divisions cellulaires.

Le premier exemple de contrôle de l'expression d'un gène a été découvert chez les bactéries. Le gène de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, qui permet aux bactéries d'assimiler le lactose, est contrôlé par deux protéines: l'une, le "répresseur", bloque l'expression du gène; l'autre, la protéine CAP l'active. En l'absence de lactose, le répresseur est fixé sur l'ADN en amont du gène, sur une région régulatrice appelée "opérateur": le gène est silencieux. En présence de lactose, un dérivé de ce sucre se fixe sur le répresseur, qui se détache de l'ADN. Le gène peut alors s'exprimer: l'enzyme ARN-polymérase se fixe sur le promoteur, et transcrit l'ADN en ARN messager (transcription). Ce dernier sera lui-même décodé en une protéine (traduction). La protéine CAP se fixe à l'ADN uniquement en l'absence de glucose, et favorise la transcription du gène par l'ARN-polymérase. Les deux protéines régulatrices, le répresseur et CAP, contrôlent ainsi le taux de transcription du gène et donc la production de  $\beta$ -galactosidase en fonction des sucres disponibles dans le milieu environnant des bactéries (travaux de J. Monod, A. Lwoff et F. Jacob de l'Institut Pasteur de Paris). Cette complexité de la régulation génétique des bactéries devait préfigurer le cas des organismes supérieurs, comme le résumait J. Monod dans son célèbre aphorisme: "*Ce qui est vrai pour la bactérie le sera pour l'éléphant*".

Functional state of the *lac* operon in wild-type *E. coli* growing in the absence of lactose.



Functional state of the *lac* operon in wild-type *E. coli* growing in the presence of lactose as the sole carbon source.

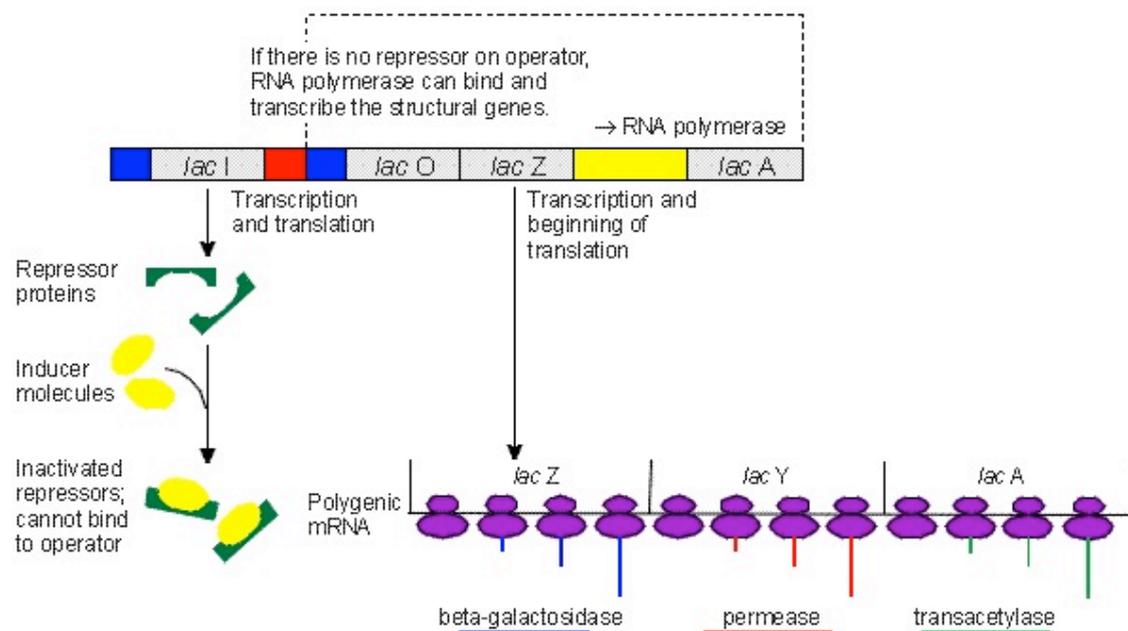


Fig. I.6 – Modèle de fonctionnement de l'operon lactose (operon *lac*).

Effectivement, le concept construit à partir des bactéries allait éclairer les recherches sur les cellules eucaryotes (chez lesquels l'ADN est enfermé dans un noyau). De façon très comparable à l'action des sucres sur la physiologie bactérienne, les hormones stéroïdes ont pour effet d'activer un jeu spécifique de gènes dans les cellules cibles. Par exemple, la progestérone induit dans les cellules de l'utérus par l'intermédiaire d'un récepteur migrant vers le noyau, la production d'ARN messagers codant pour les protéines essentielles à l'attachement du fœtus à la paroi de l'utérus.

Les domaines présentés par les protéines régulatrices (ou *facteurs de transcription*) sont très variés. Parmi les modèles les plus connus, citons: « hélice-tour-hélice » et l'homéodomaine apparenté (voir plus loin), les protéines en « doigt de zinc » comme les récepteurs nucléaires aux stéroïdes, la « fermeture-éclair à leucines », l'« hélice-boucle-hélice », et le domaine HMG. La reconnaissance repose sur des liaisons faibles entre certains acides aminés de la protéine et les bases de l'ADN (liaisons hydrogène, de Van der Waals, ou électrostatiques). Un acide aminé peut participer à la reconnaissance de plusieurs bases, et *vice versa*. Il est impossible de définir un code simple d'interaction qui ferait correspondre à chaque paire de bases de l'ADN un acide aminé de la protéine régulatrice. Le motif « fermeture-éclair à leucines » est présent dans les protéines protooncogènes *Jun* et *Fos* impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Un autre facteur de transcription important, *Pit 1*, possède un homéodomaine dont les mutations touchent très souvent le site de liaison à l'ADN. Les protéines mutées ne sont plus capables d'activer le gène de l'hormone de croissance, ce qui conduit à des sujets nains.

Dans un tissu donné, l'activité d'un gène est le résultat de l'action non pas d'une, mais de très nombreuses protéines agissant en synergie. Au sein de l'énorme assemblée protéique qui gouverne la transcription, ces facteurs peuvent agir en se fixant non seulement sur des séquences régulatrices à proximité immédiate du gène, mais aussi sur des régions de l'ADN situées à très grande distance du gène. Ces séquences régulatrices lointaines sont appelées des « enhancers » (de l'anglais qui signifie des amplificateurs). On le voit, Monod, Lwoff et Jacob ont bien prédit la richesse créative des mécanismes régulateurs élémentaires qu'ils avaient découverts chez les bactéries. Cependant, chez les organismes eucaryotes complexes, les redondances autorisent des pertes de fiabilité dans l'action de chaque facteur de transcription pris isolément. C'est le « génie » de la cellule eucaryote que d'avoir inventé cette imperfection généralisée, cette sorte de flou créateur. Il reste aux chercheurs à élaborer des théories capables de les décrire efficacement.

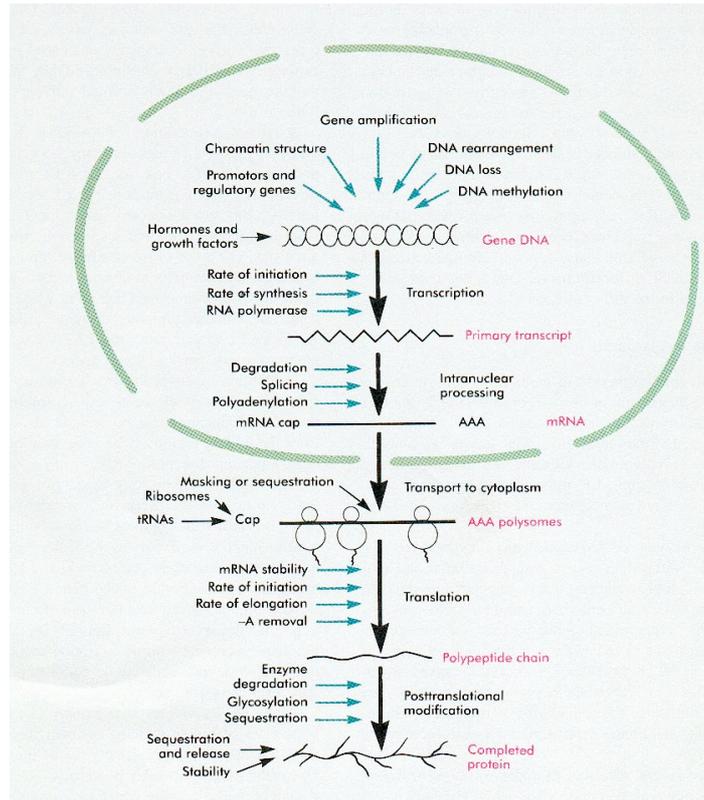


Fig. I.7 – Niveaux de contrôle depuis la transcription d'un gène jusqu'à sa traduction en une protéine.

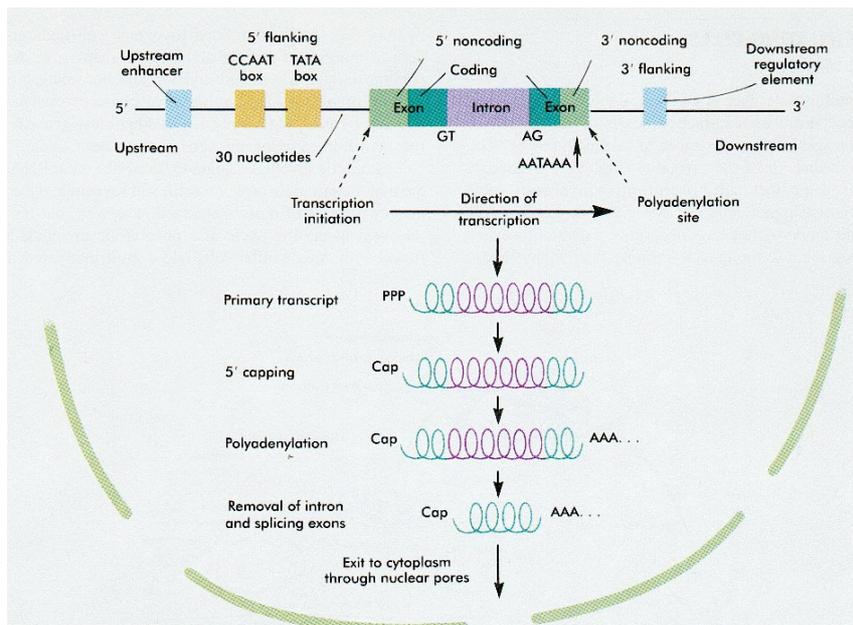


Fig. I.8 – Structure modèle d'un gène et de l'apprêtement intranucléaire de l'ARN messager.

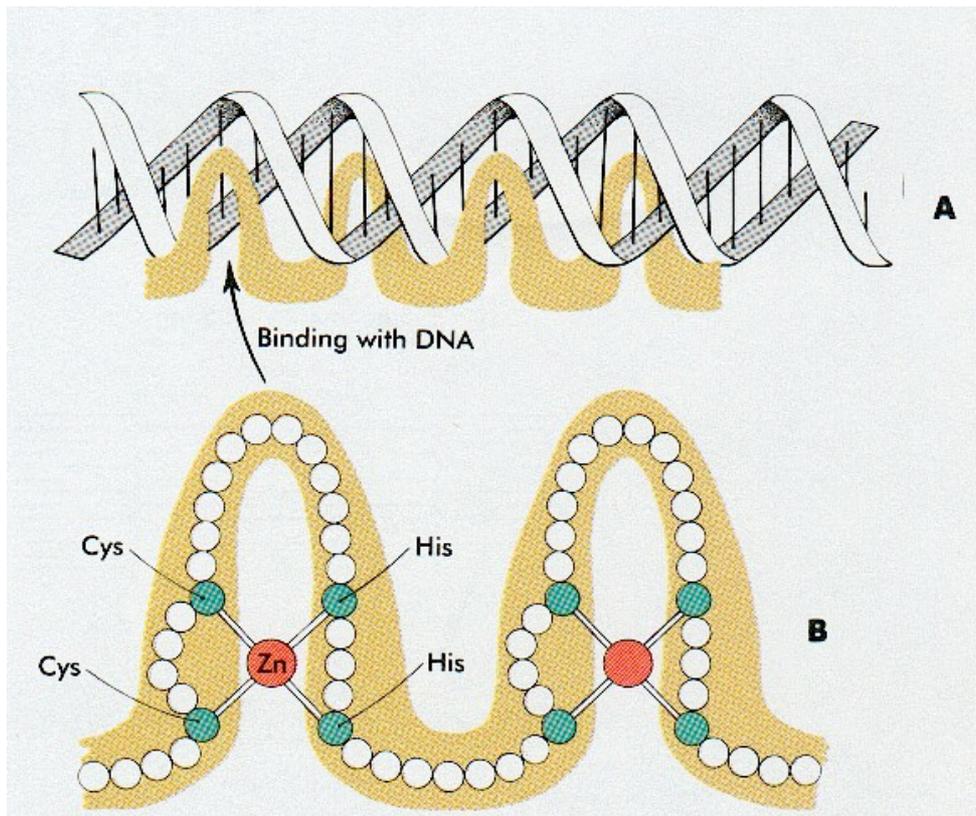


Fig. I.9 – A. Interaction entre l'ADN et un facteur de transcription en « doigt de zinc » (récepteurs nucléaires)

B. Structure générale d'un facteur de transcription en « doigt de zinc ».

### III. Les gènes et les mouches

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, l'Américain Thomas Hunt Morgan travailla beaucoup sur le développement et la régénération tissulaires. Il émit le premier des idées claires sur la façon dont les gradients pouvaient contrôler la mise en place des structures. Considérant ensuite que le développement embryonnaire était un problème trop complexe, il orienta ses recherches vers la génétique en choisissant la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* comme modèle. Ses travaux allaient révolutionner la génétique.

Morgan décrit dès 1910 une forme mutante (mâle aux yeux blancs) dont le comportement (ségrégation conjointe) est lié aux facteurs sexuels qui reposent eux-mêmes sur une différenciation chromosomique. L'observation d'une autre mutation spontanée (ailes minuscules) également liée au sexe, mais qui s'exprimait parfois indépendamment de la mutation 'yeux blancs' conduit Morgan aux hypothèses de *linkage* et de *crossing-over* (entrecroisement) des gènes comme facteurs héréditaires suivant leur position « géographique » (exprimée en unités '*morgan*') sur les divers chromosomes. La *théorie chromosomique* de Morgan repose sur le principe suivant : les facteurs de l'hérédité, les « gènes », tiennent leur base matérielle de leur répartition sur les chromosomes dont le comportement à la méiose semble correspondre à la ségrégation mendélienne. La fréquence des *crossing-over* permet alors de dessiner le plan de répartition chromosomiques des gènes. Tel fut le commencement de la théorie des bases physiques de l'hérédité et ainsi se dévoilent divers caractères liés au sexe, l'exemple par excellence étant celui de l'hémophilie. Morgan et ses collaborateurs publient en 1915 un livre clé, *The Mechanism of Mendelian Heredity*, qui établit le paradigme d'une corrélation physique des facteurs d'hérédité avec des éléments structuraux localisables sur les chromosomes. Pour de nombreux observateurs de l'époque, la théorie chromosomique de Morgan représente un immense saut de l'imagination comparable à ceux de Galilée et de Newton. Morgan reçoit en 1933 le premier prix Nobel de génétique pour avoir démontré les mécanismes de transmission héréditaire chez la drosophile. Le cadre morphologique des phénomènes génétiques est désormais bien établi et rend possible une discrimination analytique des éléments géniques de répllication normale et de mutation : ces « gènes » mendéliens paraissent en effet définir le système fondamental d'où découle la morphogenèse de l'organisme dans l'état de santé normal comme dans l'altération pathologique.

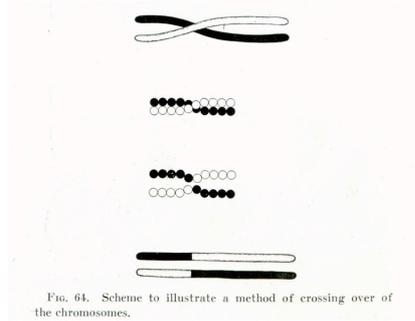


FIG. 64. Scheme to illustrate a method of crossing over of the chromosomes.

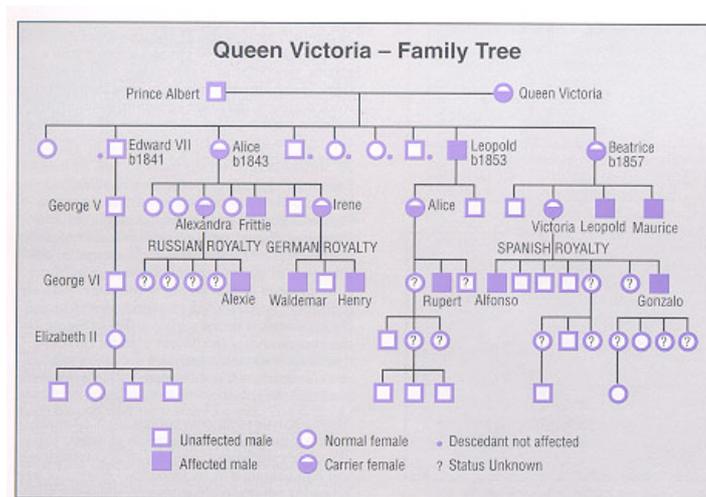
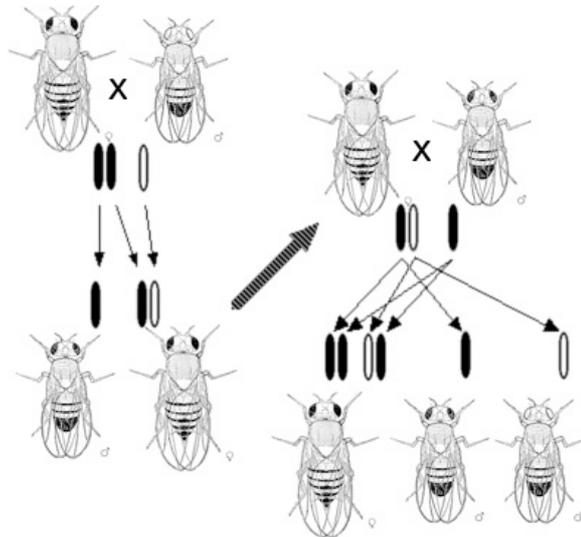


Figure 1. Queen Victoria's family tree.

Fig. I.10 - Thomas Hunt Morgan.  
 Schéma de crossing-over intrachromosomique.  
 Transmission chez la drosophile d'un caractère ('yeux blancs') lié au sexe.  
 Transmission de l'hémophilie (maladie liée au sexe) à partir de la reine Victoria.

L'association des études de génétique et d'embryologie a permis d'identifier des gènes intervenant dans le contrôle du développement embryonnaire précoce de la drosophile. Ces travaux ont conduit à la découverte d'une partie de gène, connue sous le nom d'*homeobox* (ou *homéoboîte*), permettant d'identifier les gènes régulateurs homéotiques chez de nombreux autres animaux et chez l'homme.

L'ovocyte de la drosophile a la forme d'un cylindre allongé. Le spermatozoïde pénètre à l'une des extrémités et son noyau fusionne avec celui de l'ovocyte. L'œuf ne se segmente pas, mais bien le noyau au rythme d'une division toutes les huit minutes environ. Au bout de 2-3 heures, on peut alors identifier quelques 5.000 noyaux en suspension dans le cytoplasme. Des cloisons apparaissent alors et l'embryon devient multicellulaire. La gastrulation intervient à ce stade et, au bout de 24 heures, l'embryon forme une larve segmentée capable de s'alimenter. Celle-ci ressemble peu à la mouche qui en sortira, à ceci près que l'une et l'autre sont segmentées. L'une des extrémités de la larve possède une structure de type céphalique qui permet l'absorption de nourriture. Derrière cette tête se trouvent 3 segments thoraciques suivis de 8 segments abdominaux et d'un équivalent de queue. La larve s'alimente, forme une puppe qui subit une métamorphose pour devenir une mouche. La mouche adulte possède également 3 segments thoraciques derrière la tête, suivis de 6 segments abdominaux. Ce sont les segments thoraciques qui portent les ailes et les pattes. Cette organisation segmentée est une composante fondamentale de la mouche. Même la tête est en fait constituée de parties répétées qui ont fusionné. Les différents segments sont à la fois très semblables et très différents: comprendre ce paradoxe apparent est à la base du développement de la mouche.

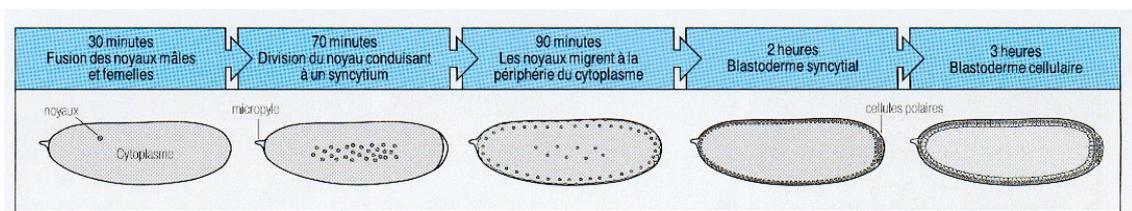


Fig. I.11 - *Segmentation de l'embryon de drosophile.*

Après fusion des pronuclei, de nombreuses mitoses interviennent, et on obtient un syncytium comprenant de nombreux noyaux dans une masse cytoplasmique unique. Après la 9<sup>e</sup> division, les noyaux migrent vers la périphérie pour former un blastoderme syncytial. Au bout de 3h environ, les membranes plasmiques apparaissent, ce qui conduit à un blastoderme cellulaire. Une quinzaine de cellules polaires environ, à l'origine des cellules germinales primordiales, s'isolent à la partie postérieure de l'embryon.

### Segmentation et organisation de l'embryon de la drosophile

De manière surprenante, les chercheurs ont observé que l'activation de certains gènes (dits « de parité ») revêt une disposition en bandes parallèles, alors que le cloisonnement cellulaire n'a pas encore eu lieu et que l'embryon est toujours au stade unicellulaire. Les gènes actifs se trouvent dans des bandes de noyaux perpendiculaires à l'axe principal de l'œuf. Le profil rayé que ce processus engendre est très caractéristique et définit les limites des « parasegments ». Sept bandes d'environ 4 cellules sont visibles au début. Elles se subdiviseront par la suite pour former les 14 parties de l'embryon, futurs segments de l'adulte.

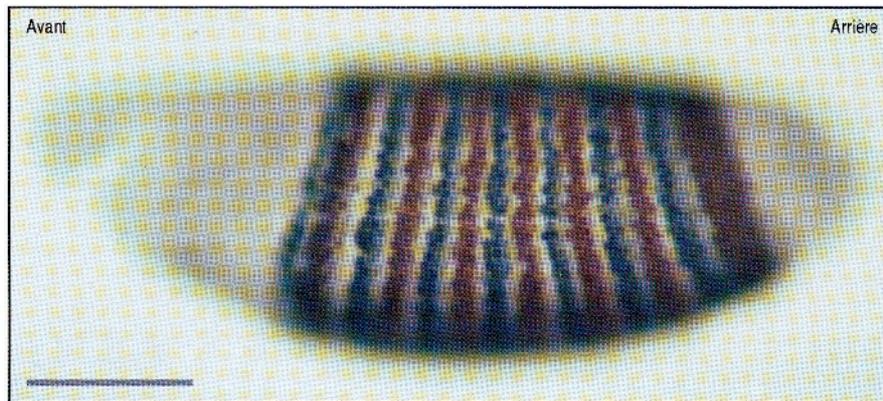


Fig. I.12 - *Expression des gènes pair-ruled le long de bandes dans l'embryon de drosophile, juste avant le passage au stade cellulaire.*  
Les parasegments sont délimités par l'expression des gènes de parité qui sont actifs dans un parasegment sur deux.  
L'expression de *even-skipped* (bleu) et *fushi tarazu* (brun) est visualisée par des anticorps couplés à des marqueurs colorés.

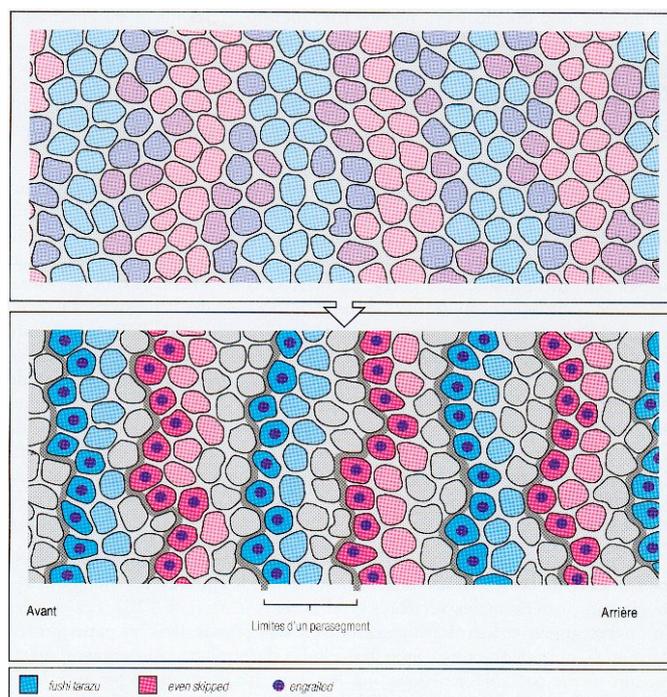


Fig. I.13 - *Expression des gènes pair-ruled fushi tarazu (bleu), even-skipped (rose) et engrailed (points violets) dans les parasegments.*  
 Le gène *engrailed* s'exprime à l'avant de chaque bande et détermine la limite antérieure de chaque parasegment. Les limites des parasegments deviennent plus nettes et plus droites au cours du temps.

La polarité de l'embryon est établie dans l'ovocyte, alors qu'il se développe dans l'organisme maternel. Une région particulière du cytoplasme, située au niveau de la future extrémité antérieure, contient le message qui permet de synthétiser la protéine codée par le gène *bicoid*. Après la ponte, cette molécule commence à être produite dans la partie antérieure; diffusant dans l'œuf, elle établit un gradient de concentration d'avant en arrière. Ce gradient établit la frontière entre la tête et le thorax et active un autre gène situé en une position bien précise de l'embryon. Le rôle que joue la protéine Bicoid dans le développement normal apparaît suite à l'induction d'une mutation dans le gène correspondant; le gradient de la protéine Bicoid fait alors défaut et l'embryon forme une larve sans tête ni thorax. On peut sauver les œufs si on leur injecte du cytoplasme prélevé dans la partie antérieure d'un autre œuf non muté. Si l'injection se fait à l'avant, un gradient normal est restauré et le développement peut avoir lieu. En revanche, si l'injection se fait dans le milieu de l'œuf, la tête apparaîtra au milieu de l'embryon. Ce cytoplasme particulier détermine donc bien la partie antérieure de l'embryon.

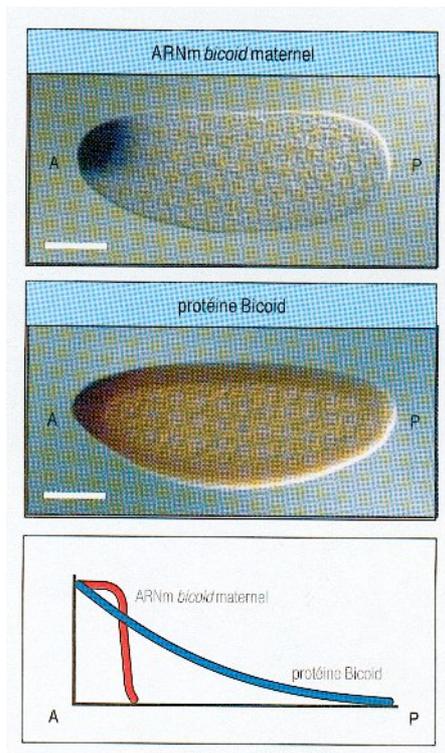


Fig. I.14 - *Distribution de l'ARNm maternel bicoid dans l'ovule et gradient de la protéine Bicoid après la fécondation.*  
 Graphique inférieur : la traduction de l'ARNm *bicoid* et la diffusion de la protéine Bicoid créent un **gradient** antéro-postérieur de cette molécule dans le corps de l'embryon.

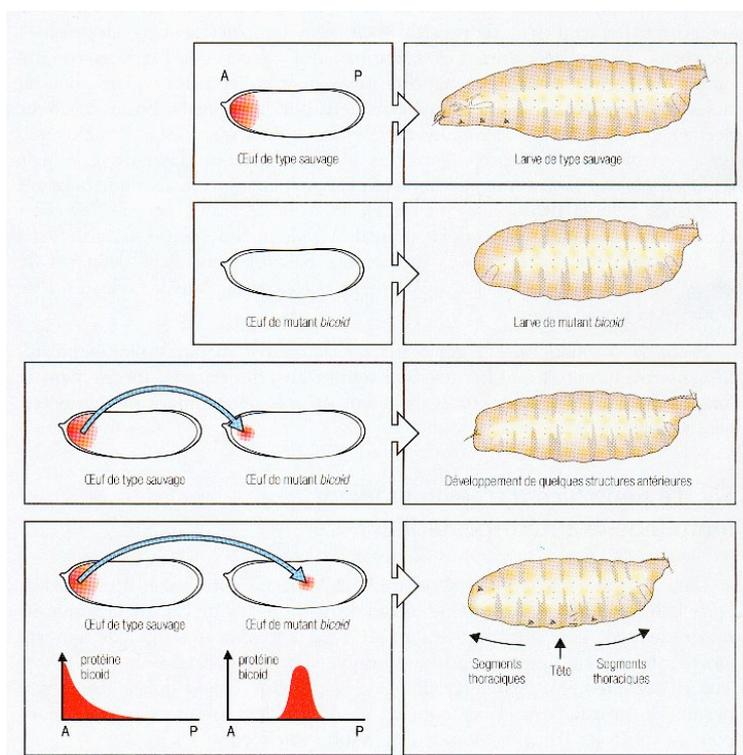


Fig. I.15 - *Le gène bicoid est indispensable à la formation des structures antérieures.*

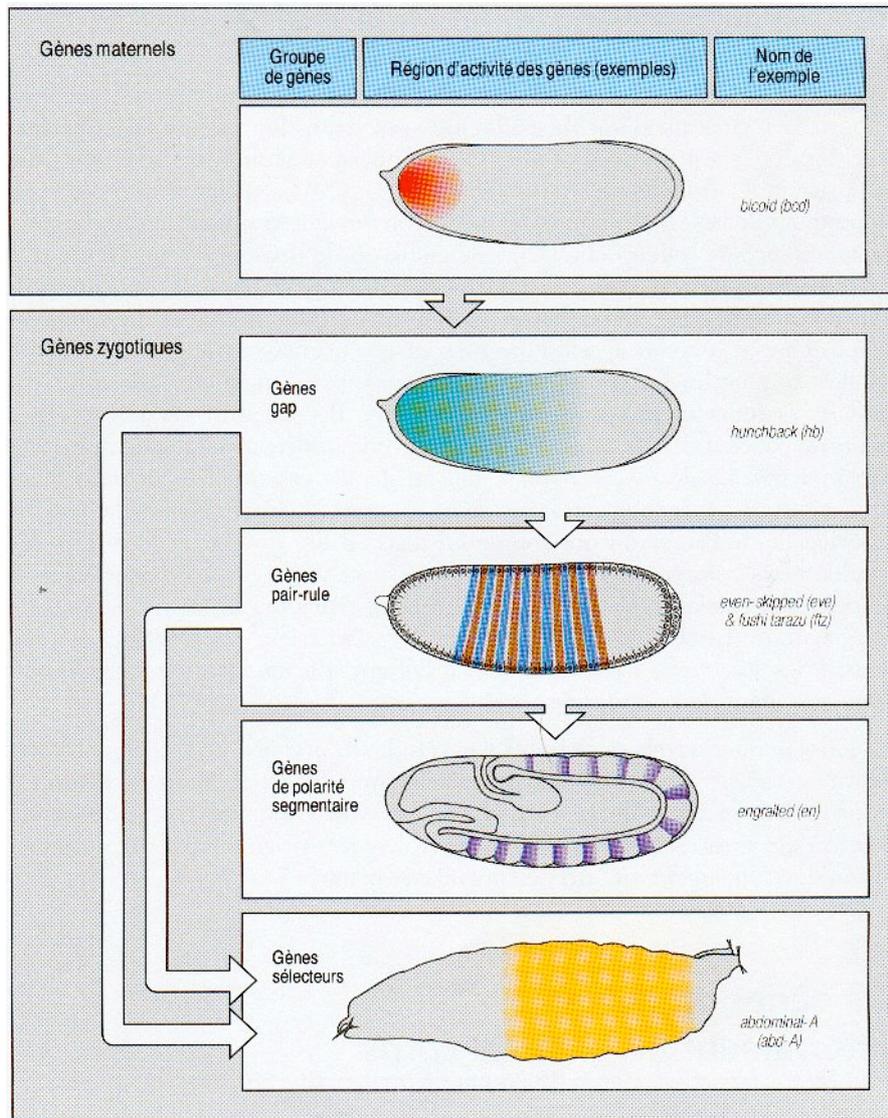


Fig. I.16 - *L'expression séquentielle de différents groupes de gènes permet la construction du corps le long de l'axe antéro-postérieur.*

Après la fécondation, les transcrits du génome maternel dans l'ovocyte (comme l'ARNm de *bicoid*) sont traduits. Ils fournissent l'information de position qui active les gènes zygotiques. Les quatre classes principales de gènes zygotiques sont les gènes *gap*, les gènes *pair-ruled*, les gènes de polarité segmentaire et les gènes homéotiques. Les gènes *gap* déterminent les différences qui existent d'une grande région du corps à l'autre, différences qui conduisent à une expression périodique au niveau des gènes *pair-ruled* qui définissent les parasegments. Les gènes de polarité segmentaire conduisent au découpage en segments et l'identité de ceux-ci est déterminée par les gènes homéotiques.

La polarité dorso-ventrale est déterminée par une série de gènes différents de ceux qui contrôlent l'axe antéro-postérieur. Là aussi, un gradient protéique intervient, mais le mécanisme qui permet sa mise en place est très différent. Au lieu d'une région particulière du cytoplasme, c'est une modification de la membrane cellulaire sur la face ventrale qui déclenche une série de réactions aboutissant à un gradient de la protéine codée par le gène *dorsal*. Le gradient du produit du gène dorsal contrôle directement le devenir des cellules. A concentration élevée (du côté ventral), elles forment du muscle; une concentration intermédiaire conduit à la formation des cellules nerveuses et les concentrations les plus basses à des cellules épidermiques.

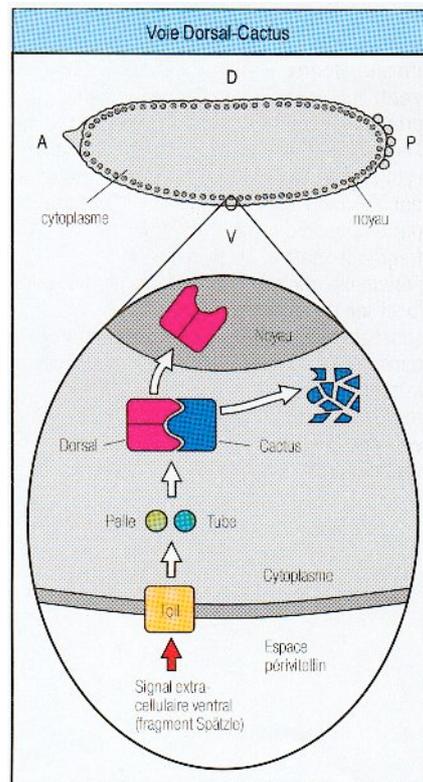


Fig. I.17 - *La protéine Dorsal est d'abord limitée au cytoplasme puis entre dans le noyau sous l'influence du signal Toll (qui dégrade Cactus).*  
Dorsal est un facteur de transcription de la famille de NF-kB qui n'exerce lui aussi son action qu'après dissociation d'un inhibiteur cytoplasmique (I-kB).

Notre compréhension actuelle du développement précoce de la drosophile est tout à fait remarquable. L'une des raisons principales de ce succès est liée au travail de Christiane Nüsslein-Volhard qui effectue ses recherches à Tübingen, non loin du lieu où Spemann découvrit le centre organisateur qui porte son nom. La plupart des gènes intervenant dans le contrôle du développement embryonnaire précoce de la drosophile (environ 50) sont aujourd'hui connus, en grande partie grâce aux recherches de cette personne.

### Les gènes homéotiques

Le terme d'« homéose » fut introduit par le généticien anglais *William Bateson* à la fin du siècle dernier pour décrire la mutation spontanée au cours de laquelle une structure pouvait être remplacée par une autre. Par exemple, chez la drosophile, la mutation *Antennapedia (Antp)* provoque la croissance d'une patte à la place d'une antenne. La mutation *bithorax* est représentée à la Figure I.18. Les **gènes homéotiques sélecteurs** (parfois surnommés gènes « architectes ») ont pour fonction d'indiquer quelle structure doit se développer en un site donné. Une mutation dans l'un des ces gènes conduit à l'apparition d'une structure à une mauvaise place. On peut dire d'une manière générale que les gènes homéotiques donnent à chaque segment une identité propre. Une transformation homéotique est donc un changement d'identité. Les mécanismes génétiques qui permettent l'apparition de la segmentation et ceux qui donnent aux segments des caractéristiques distinctes sont différents. Ces mécanismes, bien qu'indépendants, n'en sont pas moins liés.



Fig. I.18 - *Mutation spontanée bithorax de la drosophile.*  
Cette mouche porte une région du balancier transformé en région de l'aile et ont donc deux paires d'ailes.

### L'homéobox

En comparant les séquences de quelques gènes impliqués dans le contrôle du développement de la mouche, l'équipe de Walter Gehring a remarqué qu'ils possédaient une propriété tout à fait surprenante: un certain nombre d'entre eux contiennent une courte séquence homologue de 183 paires de bases, l'homéobox (ou homéoboîte), alors que le reste de la séquence diverge largement. Pourquoi l'homéobox aurait-elle été autant conservée au cours de l'évolution si elle ne jouait pas un rôle important et similaire au sein de chaque gène où elle est présente ? Tous les éléments indiquent aujourd'hui que cette séquence code pour la partie de la protéine qui se lie à l'ADN et qui intervient dans le contrôle de l'activité d'autres gènes (facteur de transcription). Cette partie de la protéine comprend 61 acides aminés et est appelée *homéodomaine*. La large conservation de l'homéobox parmi les gènes du développement chez les insectes fit espérer que la même séquence était présente chez d'autres organismes. Cet optimisme n'avait rien d'exagéré puisque des gènes à homéobox ont été trouvés chez les vers, les oursins, les poulets, les souris et les êtres humains, où ils semblent jouer un rôle crucial dans le développement. Ces gènes semblent constituer des marqueurs moléculaires de position. Par exemple, le profil d'expression des gènes à homéoboîte chez l'embryon de souris (complexes *Hox*) est strictement organisé le long de l'axe principal du corps. Certains de ces gènes ne sont exprimés que dans la région antérieure, d'autres uniquement vers l'arrière. Ceux qui sont exprimés dans la partie antérieure de la mouche ressemblent beaucoup à ceux qui le sont dans la même région chez la souris. L'expression des gènes à homéoboîte observée dans le membre de la souris en fait d'excellents candidats pour spécifier les informations de position. Comme chez la drosophile, l'agencement des gènes sur le chromosome correspond, dans ce cas, à l'ordre de leur activation chez l'embryon. L'expression des gènes *Hox* a été étudiée au cours du développement embryonnaire de la souris par la technique de l'hybridation *in situ*. Ces gènes sont fortement exprimés dans le système nerveux central et l'acide rétinoïque joue un rôle important dans le contrôle de cette expression. L'identité de position des somites (voir **Dérivés du mésoderme**, chapitre suivant) le long de l'axe antéro-postérieur est également spécifiée et déterminée par l'expression des gènes *Hox*.

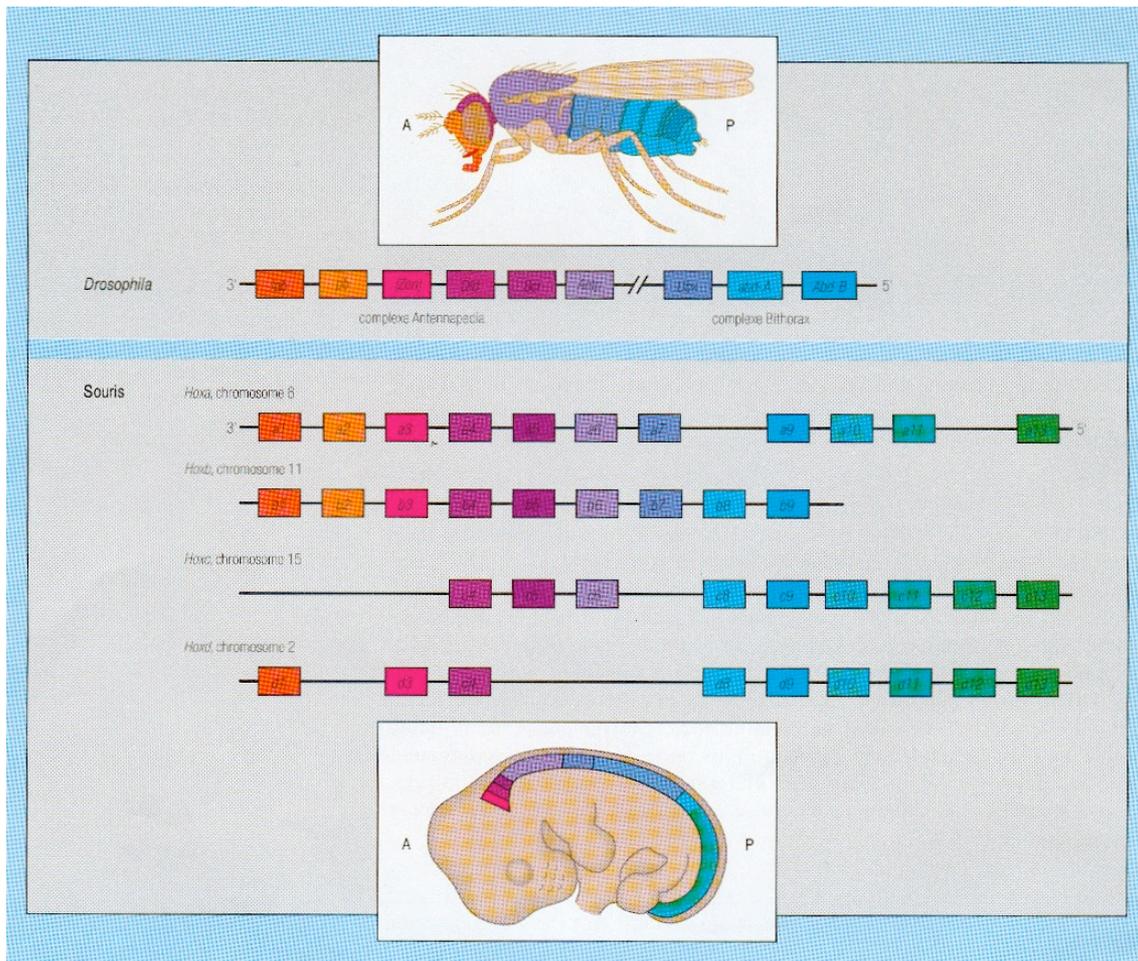


Fig. I.19 - La famille des gènes homéotiques (à homéoboîte) code pour des facteurs de transcription qui contiennent tous une même région de 61 acides aminés, capable de se fixer sur l'ADN : c'est l'**homéodomaine**. Ce dernier possède un motif structural « hélice-tour-hélice » codé par une séquence d'ADN de 183 paires de bases et appelée **homéoboîte** (ou **homeobox**). Au départ, ces homéoboîtes ont été identifiées comme des gènes contrôlant la morphogénèse et l'identité de segment chez la Drosophile. Celle-ci possède 8 gènes à homéoboîte qui sont groupés en 2 complexes HOM (Antennapedia et Bithorax) sur un seul chromosome. Des complexes analogues ont été ensuite identifiés chez de nombreuses espèces, y compris chez l'Homme. Chez les Vertébrés, ces groupes sont connus sous le nom de gènes *Hox* et, chez la souris, il existe 4 complexes *Hox*, situés sur des chromosomes différents, appelés *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* et *Hoxd*, localisés respectivement sur les chromosomes 6, 11, 15 et 2.

Les 4 complexes dérivent probablement de la duplication d'un complexe ancestral, peut-être proche du complexe *Hox* unique de l'Amphioxus, un procordé. L'homologie est surtout nette au niveau de l'homéoboîte et moins marquée ailleurs. Les gènes nés de duplication et divergence au sein d'une espèce sont dits **paralogues**, et les gènes correspondants dans les différents complexes (par exemple *Hoxa4*, *Hoxb4*, *Hoxc4* et *Hoxd4*) forment ce qu'on appelle généralement un **sous-groupe paralogue**. Chez la souris, il existe 13 de ces groupes.

Les complexes de gènes *Hox* et leur rôle dans le développement ont une origine très lointaine. Les gènes de la souris et de la grenouille, et ceux de la drosophile, sont très voisins entre eux tant par leurs séquences que par leur ordre de disposition sur le chromosome. Que ce soit chez les Vertébrés ou la drosophile, ces gènes homéotiques sont impliqués dans la spécification de l'identité de position le long de l'axe antéro-postérieur. L'une des caractéristiques remarquables de ces complexes HOM et *Hox* réside dans l'ordre des gènes sur le chromosome qui correspond à l'ordre spatial et temporel d'expression dans le corps.

Néanmoins, la plupart des gènes à homéoboîte n'appartiennent pas à un complexe homéotique et ne sont pas impliqués forcément dans des transformations homéotiques. Chez les Vertébrés, les gènes *Pax* comprennent l'homéoboîte et un autre domaine conservé dit *paired*. Tous ces gènes *Pax* codent pour des facteurs de transcription ayant des fonctions diverses dans la différenciation cellulaire.

Les gènes à homéoboîte constituent l'un des plus beaux exemples de la façon dont les recherches sur des animaux apparemment éloignés de l'homme, comme les mouches, peuvent fournir des indications fondamentales pour la compréhension des mécanismes biologiques intimes du développement humain. Des arguments de plus en plus nombreux indiquent que, même chez les formes ancestrales, des gènes à homéoboîte sont impliqués dans l'organisation spatiale de l'embryon au cours de son développement. C'est ce que ces gènes continuent aujourd'hui de faire.

## *II. Apports biotechnologiques en embryologie*

### **Manipulation du génome des mammifères**

#### *Extinction spécifique d'un gène (gene "targeting" ou "knockout")*

Les cellules de la masse cellulaire interne (cellules ES ou embryonic stem cells) peuvent être prélevées à partir du blastocyste et être cultivées *in vitro* tout en restant totipotentielles. La mutation du gène dont on veut connaître la fonction au cours du développement peut être produite en introduisant par exemple un gène de résistance à la néomycine au niveau d'un site de restriction enzymatique. Cette insertion empêche l'encodage d'une protéine fonctionnelle par le gène modifié. Le gène muté est injecté par électroporation dans des cellules ES qui sont sensibles à la néomycine. A l'intérieur du noyau, les allèles mutés remplacent les allèles sauvages par un processus appelé **recombinaison homologue**. Les enzymes actives dans la réparation et la réplication de l'ADN incorporent l'allèle muté aux dépens de l'allèle sauvage. En dépit du fait que cet événement n'est pas fréquent et non contrôlable, les cellules ES mutées peuvent être sélectionnées par culture en présence d'un excès de néomycine. La plupart des cellules ES meurent dans un tel environnement, sauf les cellules qui ont incorporé le gène de résistance à la néomycine. Les cellules résultantes ont donc ainsi un allèle normal et un allèle muté. L'injection dans des blastocystes normaux permet le développement de souris « chimères ». L'élevage de ces chimères avec des souris normales permettra l'intégration de cellules mutées au niveau de la lignée germinale et certains descendants en F1 seront hétérozygotes pour le gène étudié. L'élevage entre eux de ces hétérozygotes permettra l'apparition d'individus homozygotes pour la mutation effectuée au niveau du gène étudié (Fig. II.1).

Une pareille étude fut réalisée pour la première fois sur le gène *Hoxa-3*. Les souris homozygotes étaient dépourvues de thymus, de parathyroïdes et de thyroïde. De cette manière, le ciblage génétique permet d'analyser de manière approfondie le rôle de certains gènes au cours du développement embryonnaire. Ces études ont également

révélé les phénomènes de *redondance* importants qui président bien souvent au contrôle des fonctions importantes (exemple des gènes codant pour l'interleukine 2).

De manière générale, quatre types d'observations sont récoltées au terme de la génération d'une souris « knock-out » :

1. Mort de l'embryon *in utero* (mutation létale chez les souris homozygotes). Dans ce cas, l'observation du phénotype des souris hétérozygotes peut déjà être instructive.
2. Identification de la fonction précise remplie par le gène au cours du développement embryonnaire.
3. Identification d'une ou de nouvelles fonctions 'inattendues' (exemple du rôle pro-implantatoire du LIF).
4. Phénomène de redondance dû à l'intervention d'un autre gène qui compense la perte de fonction du gène muté.

La létalité issue de la délétion de certains gènes a poussé la recherche pour inactiver ce gène de manière spécifique dans certaines populations cellulaires. Dans la technique *Cre-loxP* (Fig. II.2), on génère des souris transgéniques exprimant la recombinase *Cre* sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un tissu (par exemple, le promoteur de *Foxn1* qui est le facteur de différenciation spécifique de l'épithélium thymique). Ces souris sont alors croisées avec d'autres souris transgéniques exprimant le gène d'intérêt (par exemple, *Igf2*) flanqué de deux sites *loxP*. Comme *Cre* recombine les deux sites *loxP*, les souris issues de ce croisement présenteront une inactivation d'*Igf2* localisée uniquement dans leurs cellules épithéliales thymiques.

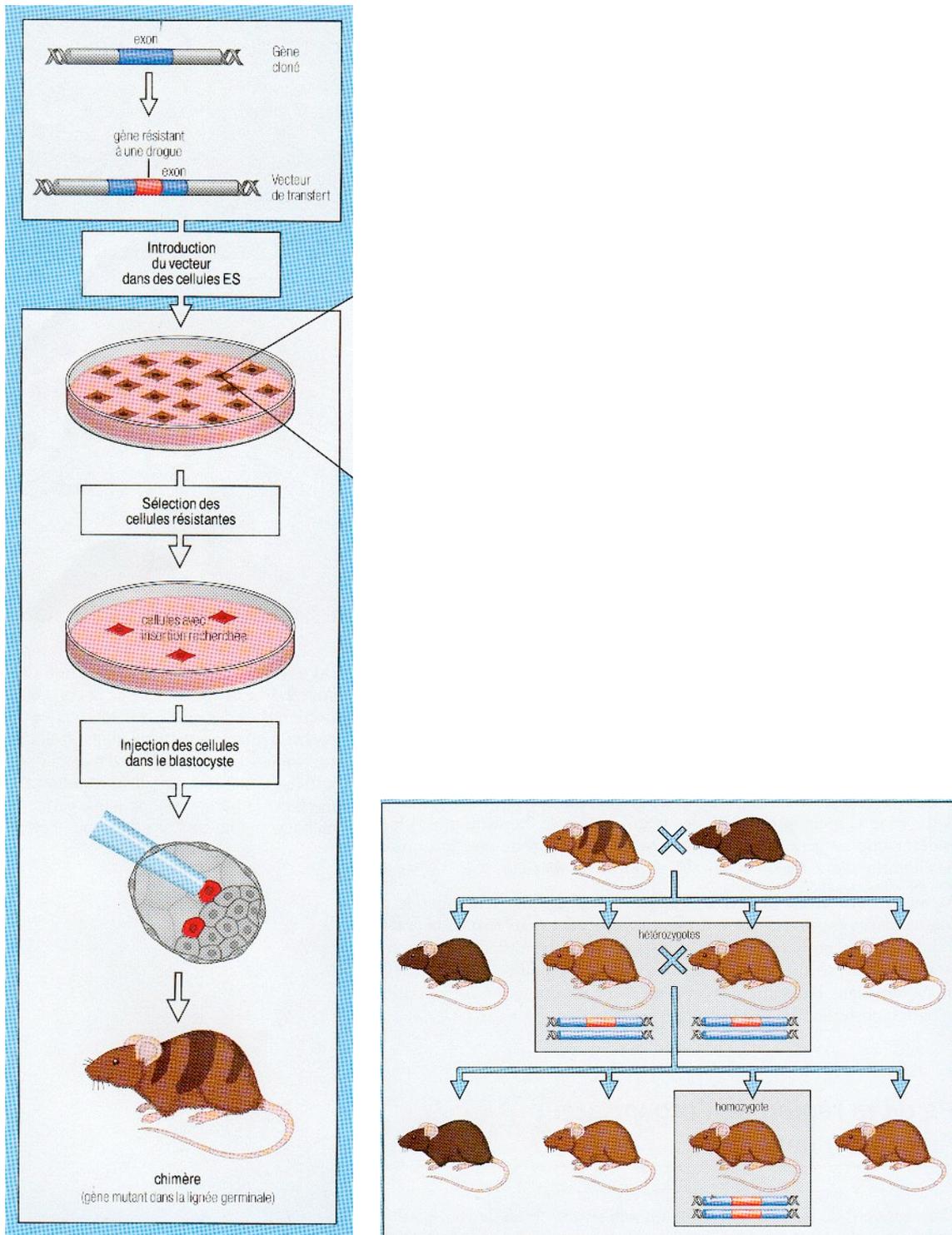
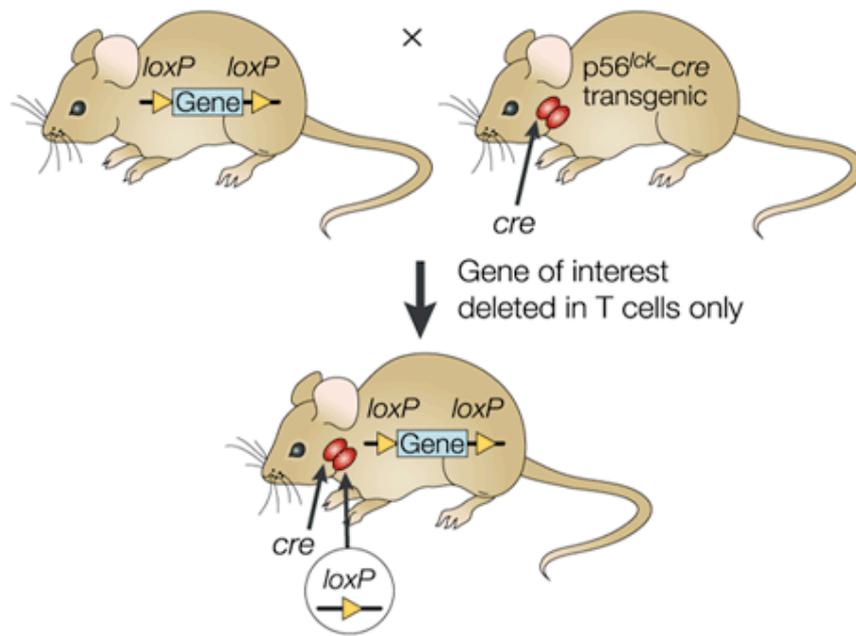
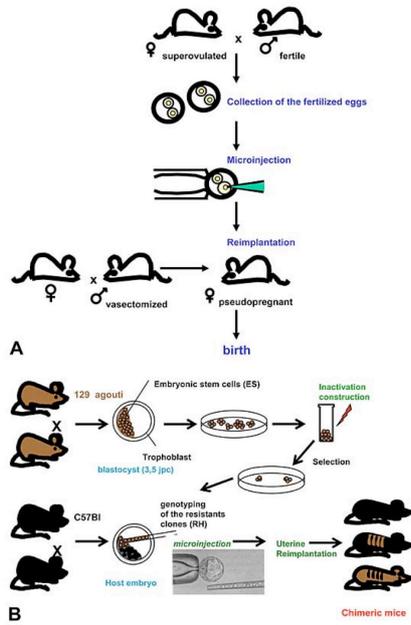


Fig. II.1 - Technique du ciblage génétique (gene "knockout").



Nature Reviews | Immunology

Fig. II.2 – Déléation d'un gène ciblée dans une population cellulaire spécifique (technique Cre/loxP).





### ***III. Gamétogenèse : ovogenèse et spermatogenèse***

Avant la fécondation, les deux cellules germinales, les *gamètes* mâle et femelle, subissent des transformations touchant à la fois le noyau et le cytoplasme.

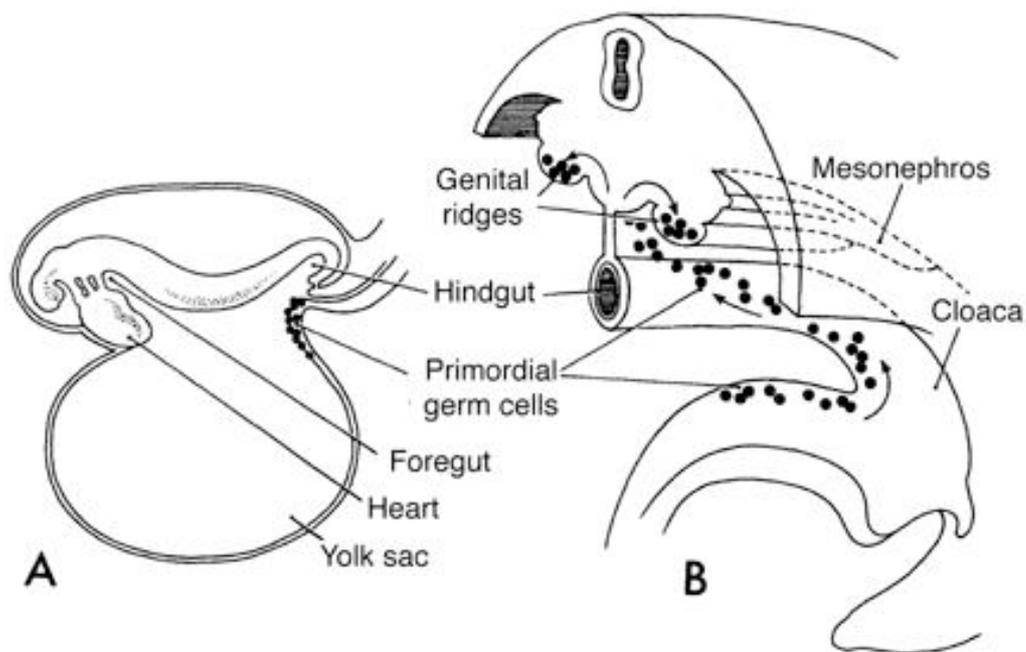
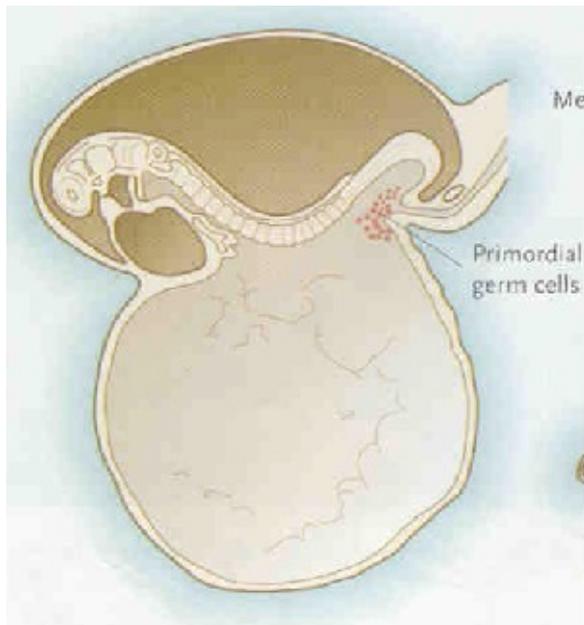
1° Réduction du nombre de chromosomes, de 46 (23 paires) dans la cellule somatique humaine, *diploïde*, à 23 dans le gamète qui est *haploïde*. Cette réduction s'effectue au cours de la *méiose*. Elle est nécessaire pour que la fusion entre gamète mâle et gamète femelle ne donne pas un œuf ayant un nombre de chromosomes double de celui des parents.

2° Adaptation morphologique des gamètes à la fécondation. Le gamète mâle ou *spermatozoïde* perd la grande partie de son cytoplasme, développe une tête, un corps et une queue (flagelle). Le gamète femelle ou ovocyte accroît son cytoplasme jusqu'à devenir l'une des plus grosses cellules de l'organisme (diamètre à la maturité =  $\pm 120 \mu\text{m}$ ).

#### **Origine des cellules germinales primordiales (gonocytes) (Fig. III.1)**

Dans l'embryon humain, les cellules germinales primordiales qui vont aboutir à la formation des gamètes apparaissent à la 4<sup>e</sup> semaine comme des cellules ovoïdes, peu différenciées au niveau de l'*endoderme* du *sac vitellin*. Par des mouvements amiboïdes, elles migrent vers la paroi du tube digestif, puis de celui-ci via le mésentère vers les glandes sexuelles ou *gonades* primitives au niveau de la paroi postérieure du corps.

Sous l'influence des cellules germinales primordiales qui y ont migré, l'épithélium cœlomique et le mésonephros adjacents prolifèrent et forment les *cordons sexuels primitifs*. Ceux-ci abritent les gonocytes et donnent naissance aux tissus spécialisés qui assureront la nutrition et le contrôle de la différenciation des gamètes sexuels définitifs : la *granulosa* des *follicules ovariens* chez la femme, les *cellules de Sertoli* de l'*épithélium germinatif* des *canaux séminifères* chez l'homme. Les cellules primordiales qui ne parviennent pas à migrer au bon endroit dégèrent ou s'engagent dans une méiose prématurée et meurent ensuite. Inversement, en l'absence de cellules primordiales, il n'y a développement ni des cordons sexuels, ni des gonades.



Medscape®

<http://www.medscape.com>

Fig. III.1.- Schéma d'un embryon humain de trois semaines montrant la situation des cellules germinales primordiales dans la paroi postérieure de la vésicule vitelline, puis leur migration vers la paroi postérieure de l'abdomen primitif.

Le déroulement de la gamétogenèse diffère selon le sexe incriminé. Chez l'homme, les cellules primordiales demeurent en sommeil depuis la 6<sup>e</sup> semaine de la vie fœtale jusqu'à la puberté. A ce moment, les tubes séminifères se développent et les cellules germinales se différencient en *spermatogonies*.

Chez la femme par contre, les cellules primordiales se multiplient d'abord par mitoses suivant leur interaction avec les cordons sexuels primitifs, puis se différencient en *ovogonies*. A la 12<sup>e</sup> semaine de la vie fœtale, elles s'engagent dans une première phase de la méiose puis un arrêt survient qui persiste jusqu'à la puberté. Ce n'est qu'à ce moment que l'ovogenèse reprendra son cours sous l'influence des variations mensuelles caractéristiques de certaines hormones antéhypophysaires, les *gonadotrophines*.

### **La méiose** (Tableau I & Fig. III.2)

C'est un processus limité aux cellules germinales, par lequel une cellule diploïde produit par deux divisions successives quatre cellules haploïdes. La *ploidie* réfère au nombre de copies de chaque chromosome présent dans le noyau cellulaire. Les cellules somatiques et les cellules germinales primordiales contiennent 2 copies de chaque chromosome et sont *diploïdes*. Les gamètes mûrs par contre possèdent une seule copie de chaque chromosome et sont *haploïdes*.

La méiose comprend deux divisions cellulaires séparées par une courte interphase.

#### **Première division méiotique (méiose réductionnelle)**

Le nombre total des chromosomes chez l'homme est de 46, dont 22 paires de chromosomes homologues, les *autosomes*. Les deux chromosomes restants sont les *chromosomes sexuels* (XX et XY) qui déterminent le sexe de l'individu. Comme dans la mitose, la phase initiale de la méiose comprend une réplication de l'ADN qui conduit à une cellule diploïde de 4C (le nombre C indique le nombre de copies de chaque brin d'ADN par chromosome). Chaque chromosome est alors formé de deux brins parallèles, les *chromatides sœurs*, qui sont jointes par une structure appelée *centromère*.

Au stade suivant, ou *prophase I*, les chromosomes se condensent en structures compactes. Des nodules de recombinaison apparaissent par intervalles (*chiasmata*) et des échanges entre chromosomes peuvent intervenir à ce moment par enjambement (ou *crossing-over*). Le crossing-over (Fig. I.3) permet l'échange de segments d'ADN entre deux chromatides non sœurs (l'une d'origine maternelle et l'autre d'origine paternelle). Les régions homologues portées par les chromatides non sœurs se croisent et se recombinent ensuite au chromosome. C'est là un processus de recombinaison génétique intra-chromosomique, qui se déroule complètement au hasard, et qui contribue ainsi à la variabilité génétique des futurs gamètes.

Pendant la *métaphase I*, l'enveloppe nucléaire disparaît, le fuseau se met en place et les bivalents se séparent de façon à ce que chacun des deux centromères homologues (l'un d'origine maternelle, l'autre d'origine paternelle) se situe de part et d'autre du plan équatorial.

Au cours de l'*anaphase I* de la première division méiotique, chaque chromosome bivalent, entraîné par son centromère, guidé par un fuseau de fils très fins, migre vers un des pôles de la cellule, de façon à reconstituer une collection comprenant un chromosome (dédoublé) de chaque catégorie. Un sillon se creuse entre les deux parties de la cellule; elles se séparent et constituent deux cellules, chacune de type haploïde et dotée de 23 chromosomes dédoublés (2C).

### Deuxième division méiotique (méiose équationnelle)

L'interphase entre les deux divisions de la méiose est l'*intercinèse*. Elle est courte et ne comporte pas de synthèse d'ADN. Les chromosomes réapparaissent à la prophase II de la deuxième division méiotique qui reproduit en fait les phases d'une mitose classique. Les deux cellules haploïdes 2C vont ainsi donner quatre cellules haploïdes 1C, dotées chacune de 23 chromosomes en un exemplaire. Ces cellules finales ont un patrimoine génétique semblable dans sa structure à celui des gamètes du cycle de reproduction précédent (de la génération précédente), mais il comporte un mélange des deux origines.

La méiose est donc le mécanisme connu le plus ingénieux et le plus performant capable d'assurer la diversification génétique au sein d'une espèce animale donnée. L'orientation indépendante des bivalents à la métaphase I engendre de nombreuses combinaisons chromosomiques ( $2^{23}$  ou 8.388.608 combinaisons possibles chez l'homme !). Dans ces conditions, la probabilité pour que tous les chromosomes de même origine se retrouvent dans la même cellule fille est quasi nulle. Si la méiose permet la transmission héréditaire des caractères, le crossing-over favorise aussi la recombinaison de gènes et ce brassage intra-génomique est une autre source importante de diversification au sein d'une même espèce.

Le résultat de certains *brassages d'exons* (séquence codante de nucléotides au sein d'un gène), en anglais, *exon shuffling*, a parfois donné naissance à de nouvelles protéines apportant un avantage sélectif important au sein d'une espèce animale. Ces exons codent pour des domaines protéiques se caractérisant par un haut degré de conservation au cours de l'évolution. Ce mécanisme fondamental a aussi contribué à la diversification du monde vivant.

Au cours de la mitose des cellules somatiques, le génome reste inchangé. Lors de la transmission sexuée du patrimoine génétique, un nouveau génome original est mis en place dans chaque œuf grâce aux processus de diversification génétique de la méiose et de la réunion des gamètes à la fécondation.

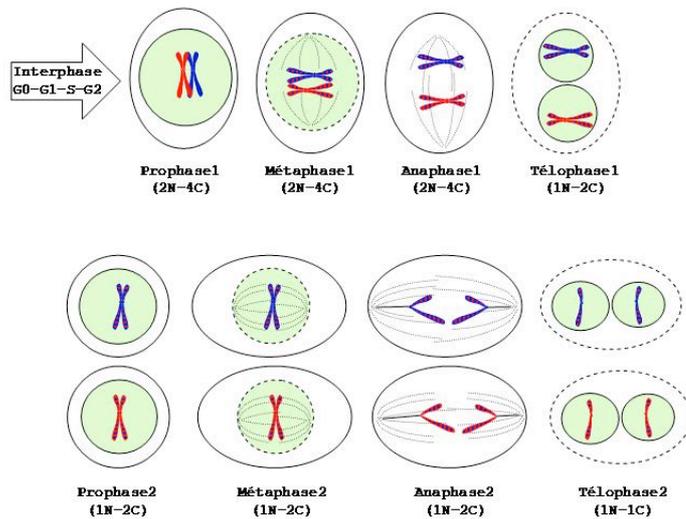


Fig. III.2. *Représentation schématique des deux premières divisions méiotiques. A côté, le « découvreur » de la méiose, Edouard Van Beneden (1846 – 1912), professeur à l'université de Liège*

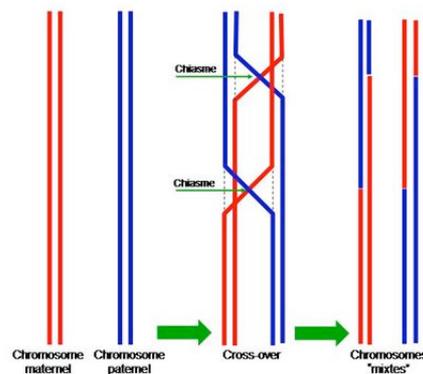


Fig. III.3 *Représentation schématique du « crossing-over » ou enjambement de chromatides*

**Tableau I: Evènements de la méiose dans les lignées germinales**

STADE	EVENEMENTS	CELLULE	GENOME
<b><u>Méiose I</u></b>		Ovogonie Spermatogonie	<b>Diploïde</b> <b>2N 2C</b>
Préparation	Réplication d'ADN	Ovocyte 1 Spermatocyte 1	<b>Diploïde</b> <b>2N 4C</b>
Prophase I	Condensation Chiasma Crossing-over		
Métaphase I	Alignement équatorial Absence de réplication des centromères		
Anaphase & télophase I	Distribution à chaque cellule-fille Division cellulaire		<b>Haploïde</b> <b>1N 2C</b>
		<i>Ovocyte 2aire + 1er globule polaire</i>	
		<i>2 spermatocytes 2aires</i>	
<b><u>Méiose II</u></b>			
Prophase II	Absence de réplication d'ADN Condensation chromosomique		
Métaphase II	Alignement équatorial Réplication des centromères		
Anaphase & télophase II	Séparation des chromosomes Division cellulaire		<b>Haploïde</b> <b>1N 1C</b>
		<i>Ovocyte + 3 globules polaires</i>	
		<i>4 spermatides</i>	

## L'ovogenèse

Après leur arrivée au niveau des cordons sexuels primitifs, les cellules de la lignée germinale femelle entament une série de divisions mitotiques et se différencient en *ovogonies*. A la 12<sup>e</sup> semaine de la vie fœtale, une partie de ces millions d'ovogonies s'engagent dans la première division méiotique et s'arrêtent presque immédiatement à un stade quiescent. Le noyau de ces ovules au repos contient les chromosomes partiellement condensés de la prophase I. Il s'agrandit et forme la *vésicule germinale* qui protège l'ADN pendant la longue période de l'arrêt méiotique. Chez certaines espèces (amphibiens), les chromosomes se décondensent et forment des boucles latérales prenant l'aspect d'écouvillon.

L'ovule est une cellule qui s'est différenciée de manière à être le gamète contenant tous les facteurs nécessaires pour initier et maintenir le métabolisme et le développement du produit de la fertilisation. Donc, en plus d'un noyau haploïde 1N 2C, l'ovule constitue aussi une réserve d'enzymes cytoplasmiques, des ARN messagers, des organites, et des substrats métaboliques. Le *vitellus* est particulièrement abondant dans les œufs qui se développent en individus de grande taille hors du corps (oiseaux, reptiles,...). La partie de l'enveloppe externe en contact avec la membrane plasmique de l'ovule s'appelle, chez les mammifères, la *membrane pellucide* et, chez les autres vertébrés et les invertébrés, la *membrane vitelline*.

Chaque ovocyte primaire est entouré par une couche de cellules épithéliales folliculaires dérivées des cordons sexuels primitifs. Cette capsule et l'ovocyte primaire qu'elle entoure constituent un *follicule primordial*. A 5 mois, le nombre de follicules primordiaux dans les ovaires est de 7 millions environ. La plupart de ces follicules dégénèrent. A la naissance, on n'en dénombre plus que de 700.000 à 2 millions, et à la puberté, il n'y en a plus que 400.000 environ.

## Maturation folliculaire ou folliculogenèse

Au cours d'un *cycle menstruel*, la femme normale produit chaque mois un seul gamète et conditionne l'utérus de manière à pouvoir y recevoir un embryon. A la *ménarche* (puberté féminine), les cycles menstruels apparaissent suite à la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope. De manière arbitraire, il est convenu que le premier jour d'un cycle menstruel correspond à l'apparition des règles

(*menstruation*). Le 5<sup>e</sup> jour du cycle, l'hypothalamus sécrète un petit peptide (*GnRH*) qui à son tour stimule la sécrétion par l'hypophyse des deux *gonadotrophines*: l'*hormone lutéinisante (LH)* et l'*hormone folliculo-stimulante (FSH)*. Cette élévation de la FSH et de la LH initie la folliculogénèse dans l'ovaire et la phase proliférative au niveau de l'endomètre utérin.

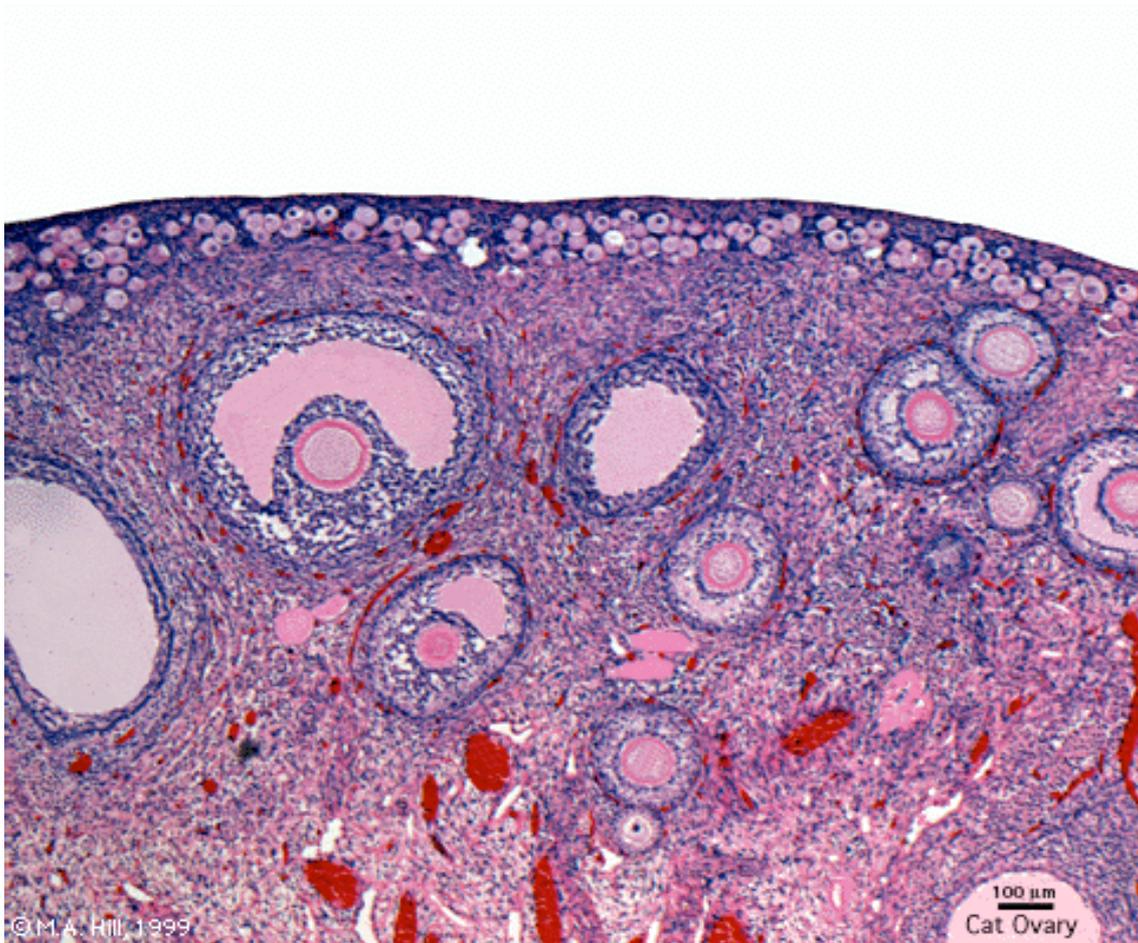


Fig. I.4 Coupe d'un ovaire de chatte montrant plusieurs follicules ovariens en cours de maturation

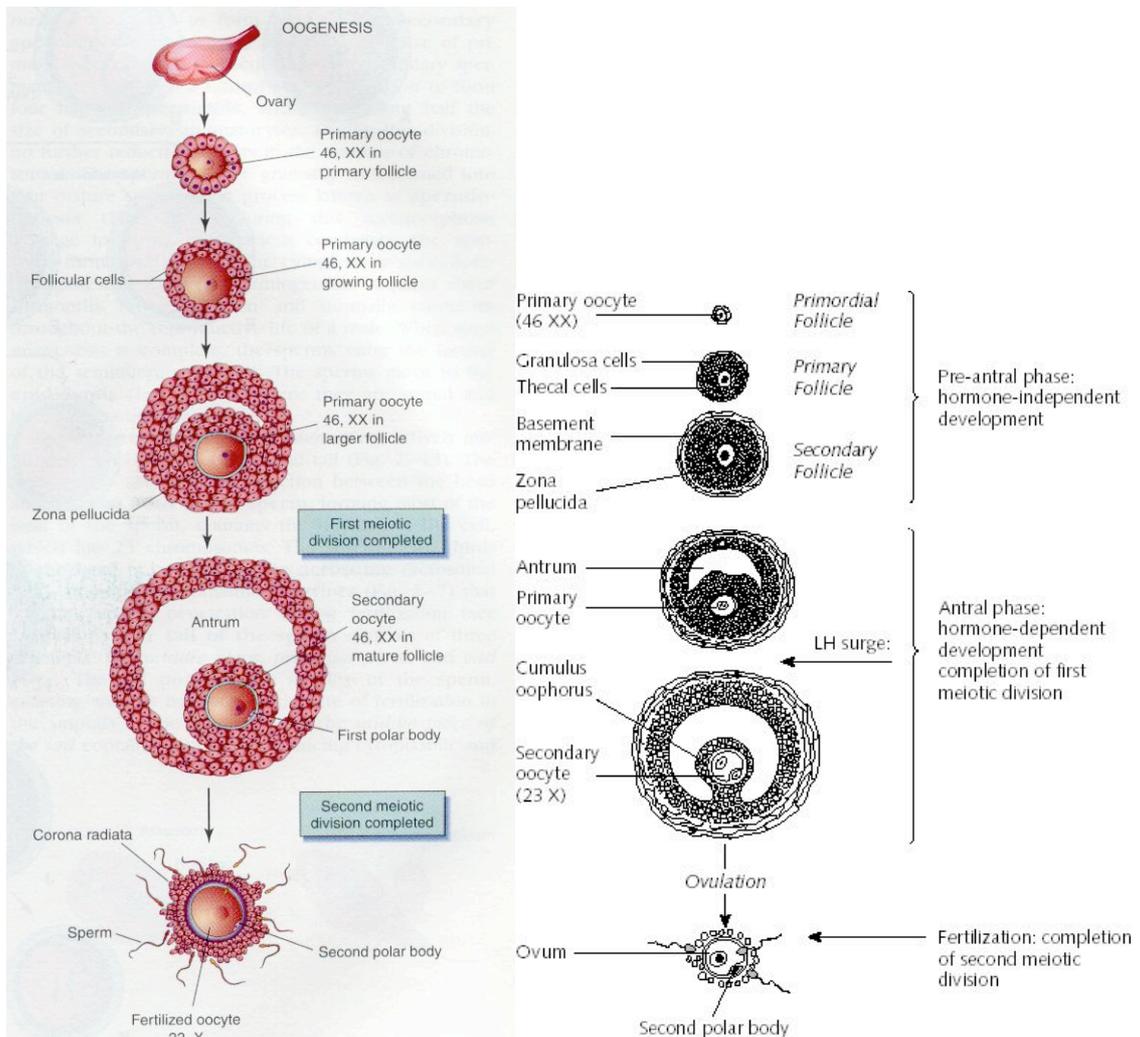


Fig. III.5 Stades de l'ovogenèse humaine : représentation schématique de la maturation d'un follicule ovarien

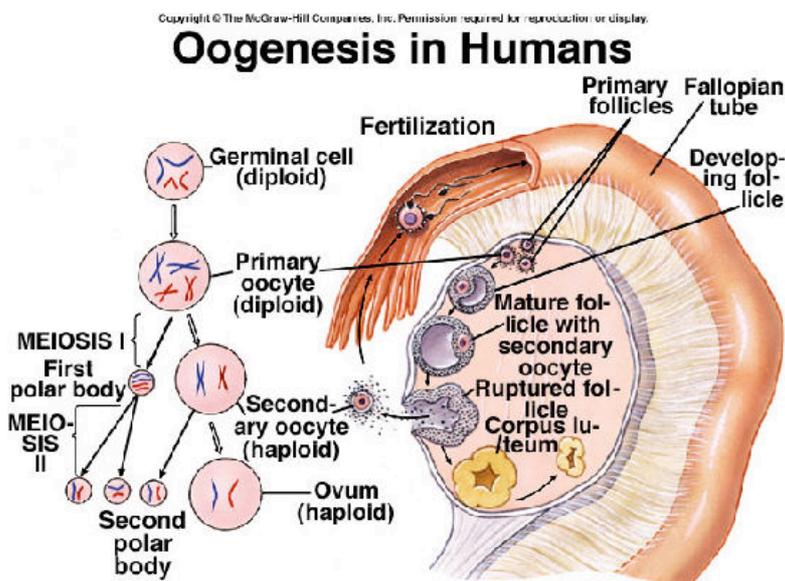


Fig. III.6 Autre représentation schématique de l'ovogenèse humaine reprenant les rapports anatomiques de l'ovaire de d'une trompe utérine (de Fallope)

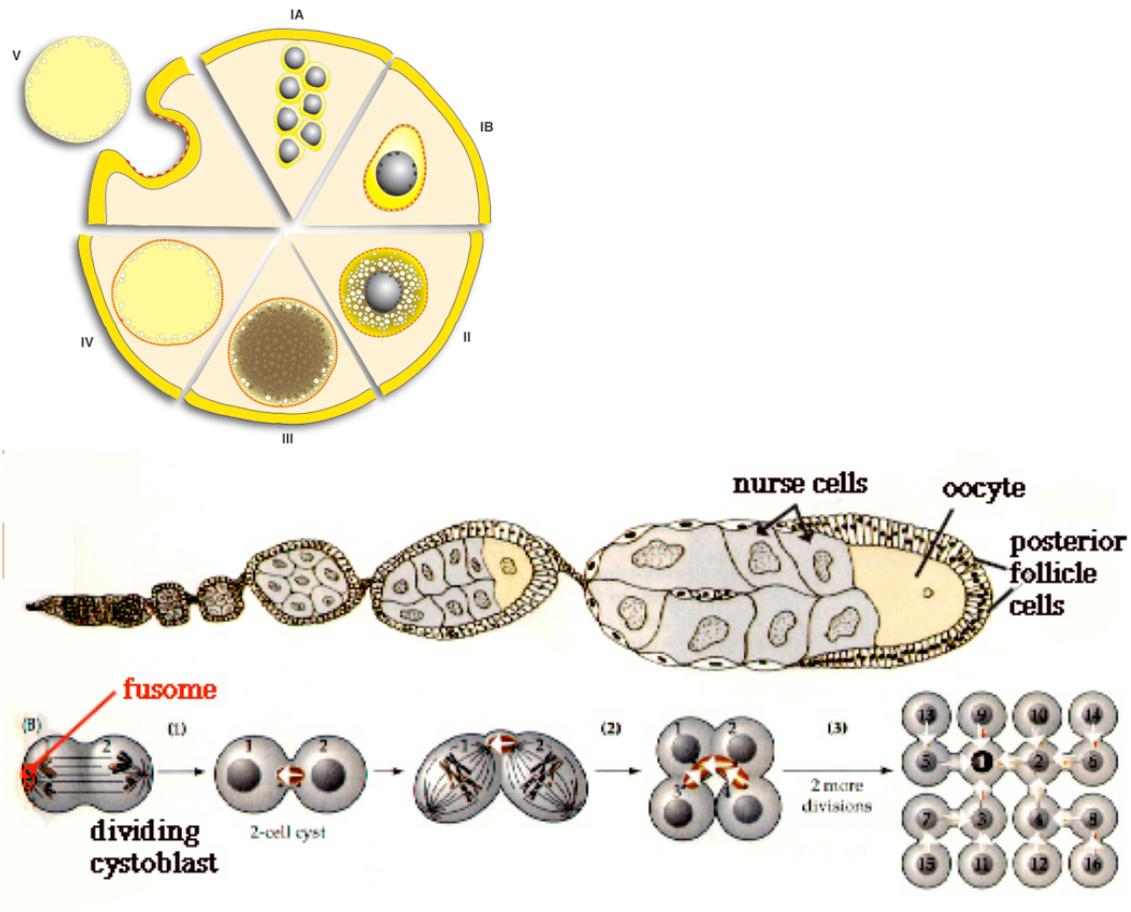


Fig. III.7 Conservation phylogénique des grands principes : ovogenèse chez le poisson-zèbre et la drosophile

L'élévation de la FSH stimule la croissance de 5 à 12 follicules primordiaux. Les cellules épithéliales deviennent cuboïdes, puis prolifèrent pour former une capsule de plusieurs couches. La zone pellucide devient de plus en plus visible à la limite entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. Parmi les 5-12 follicules en maturation, certains arrêtent de se développer, alors que les autres grandissent et se creusent d'une cavité centrale ou *antre folliculaire*, remplie d'un liquide constitué des sécrétions des cellules folliculaires. Les follicules portent alors le nom de *follicules antraux*. Au même moment, le tissu conjonctif du stroma ovarien péri-folliculaire se différencie en deux couches, la thèque interne et la thèque externe qui se vascularisent (contrairement au follicule lui-même) (Fig. III.5 et III.6).

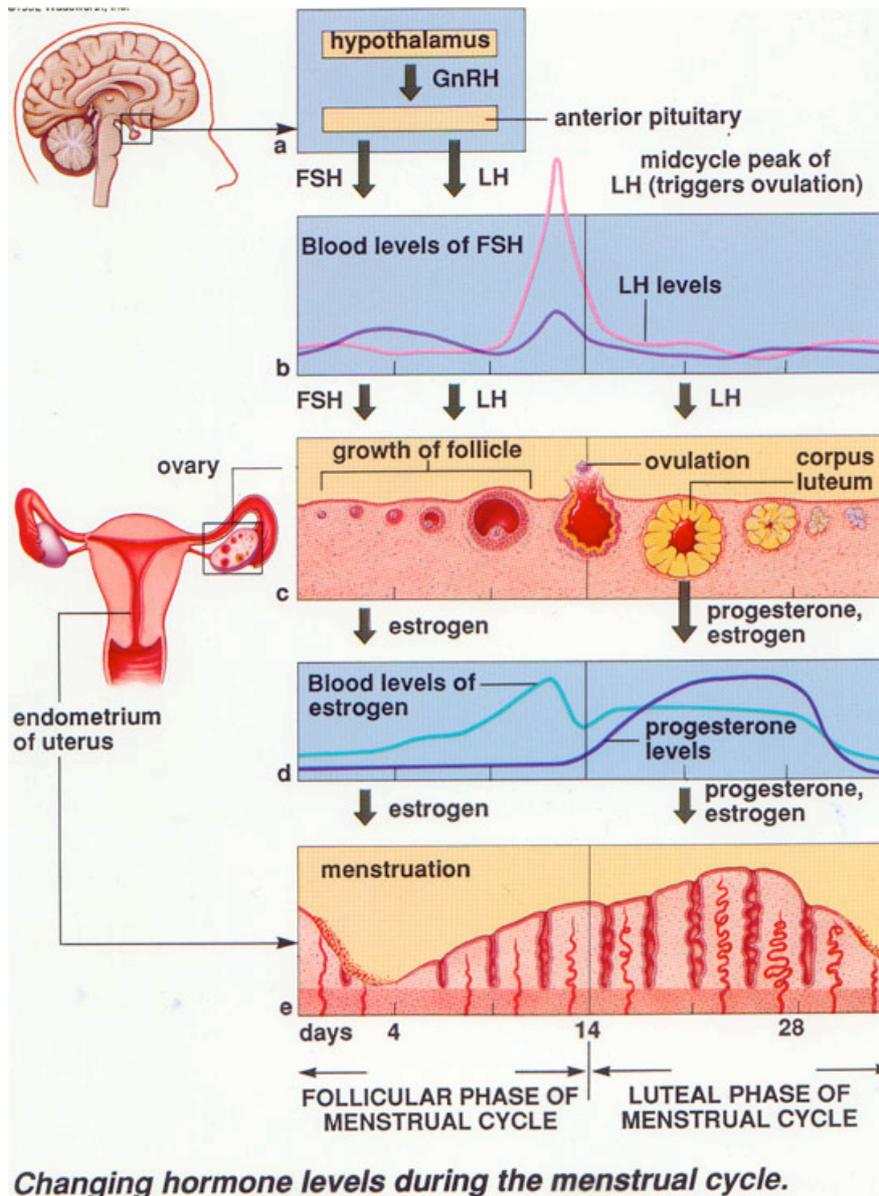


Fig. III.8 Modifications hormonales au cours du cycle menstruel de la femme

Un des follicules devient *dominant* et continue à s'agrandir. L'ovocyte de ce follicule est complètement entouré par des cellules folliculaires (le *cumulus oophorus*) et, à ce stade, l'ovocyte n'a pas encore complété sa méiose. Le mécanisme moléculaire permettant la sélection d'un et un seul follicule dominant n'est pas encore compris à l'heure actuelle.

La reprise de la méiose est un phénomène biologique encore inexpliqué. La communauté scientifique s'accorde à penser que des facteurs gonadiques locaux pourraient être directement impliqués dans ce processus, éventuellement par la levée d'un inhibiteur de la méiose.

Le 13-14<sup>e</sup> jour du cycle, les taux circulants de FSH mais de LH surtout augmentent brusquement (*pic ovulatoire*). La méiose du *follicule de de Graaf* dominant se complète à ce moment précis. La première division méiotique aboutit à la formation de l'ovocyte secondaire et à l'expulsion du premier globule polaire. La seconde division méiotique commence s'engage immédiatement mais, environ 3 heures avant l'ovulation, l'ovocyte secondaire arrête la méiose qui ne reprendra qu'avec la fécondation, et plus exactement avec la fusion des membranes plasmiques du spermatozoïde et de l'ovule.

## La spermatogenèse

Si l'ovule constitue une des plus grosses cellules de l'organisme ( $\pm 120 \mu\text{m}$ ), le spermatozoïde est une des plus petites ( $\pm 4 \mu\text{m}$ ). Son activité principale est la transmission de son jeu haploïde de gènes paternels, et cette cellule s'est remarquablement adaptée à cette fonction. Elle contient un flagelle destiné à le propulser dans un milieu aqueux et de nombreuses mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire à sa motilité. Cet apport énergétique est fondamental lorsque l'on sait qu'à l'échelle, le trajet d'un spermatozoïde jusqu'à l'ovule équivaut au voyage Liège-Pékin pour un homme !

La *tête* du spermatozoïde contient le noyau haploïde très compact où les chromosomes sont dépourvus d'histones. La tête est coiffée d'une vésicule remplie d'enzymes hydrolytiques, l'*acrosome*, qui jouera un rôle important dans le processus de fertilisation proprement dit (voir plus loin). La *pièce intermédiaire* renferme de grandes mitochondries hélicoïdales. La *queue* contient les micro-tubules assemblés selon une disposition particulière destinée à former le système de propulsion.

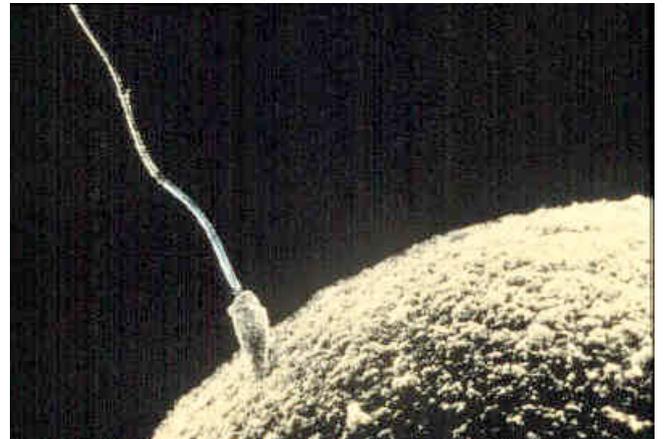
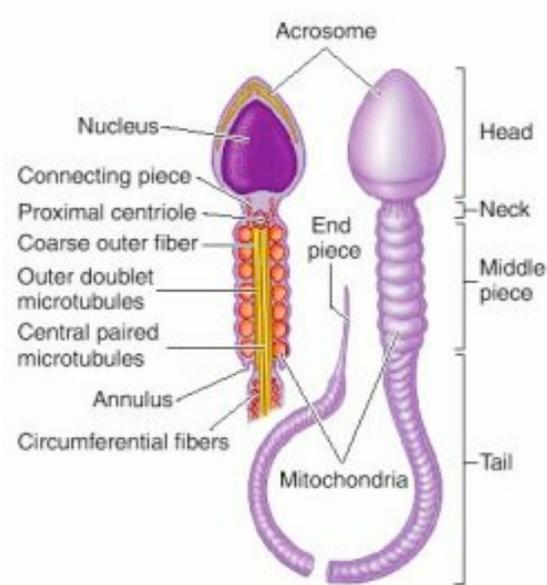


Fig. III.9 Structure d'un spermatozoïde et vue en microscopie à balayage d'un spermatozoïde au contact de la corona radiata d'un ovocyte expulsé

La spermatogenèse commence au moment de la puberté chez le garçon. Suite à la maturation de l'axe gonadotrope, le testicule se met à sécréter de plus en plus de testostérone. Celle-ci, en synergie avec la FSH hypophysaire, stimule l'activité des

*cellules de Sertoli*. Ces grandes cellules “nourrices” contrôlent étroitement la différenciation des cellules germinales primordiales en spermatogonies. Certaines cellules filles cessent de se diviser et engagent leur méiose pour donner des spermatocytes primaires, secondaires, puis des spermatides, et enfin des spermatozoïdes. L'ensemble du clone dérivé d'une spermatogonie est relié par des ponts cytoplasmiques. La *cytodiérèse* est en effet incomplète.

La différenciation des spermatozoïdes est vraisemblablement sous le contrôle des communications chimiques entre les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinale. Le terme « *cryptocrine* » qualifie cette forme de communication cellulaire particulière se déroulant dans un microenvironnement spécialisé dans la différenciation d'une cellule d'un type donné. Il y a deux exemples au moins de communication cryptocrine dans le corps humain : dans le testicule, entre les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinale mâle, et dans le thymus, entre les cellules nourrices de l'épithélium thymique et les cellules de la lignée des lymphocytes T (thymo-dépendants).

La *capacitation* est la dernière étape de maturation que subit le spermatozoïde au cours de son voyage depuis les canaux séminifères jusqu'à l'ampoule de l'oviducte.

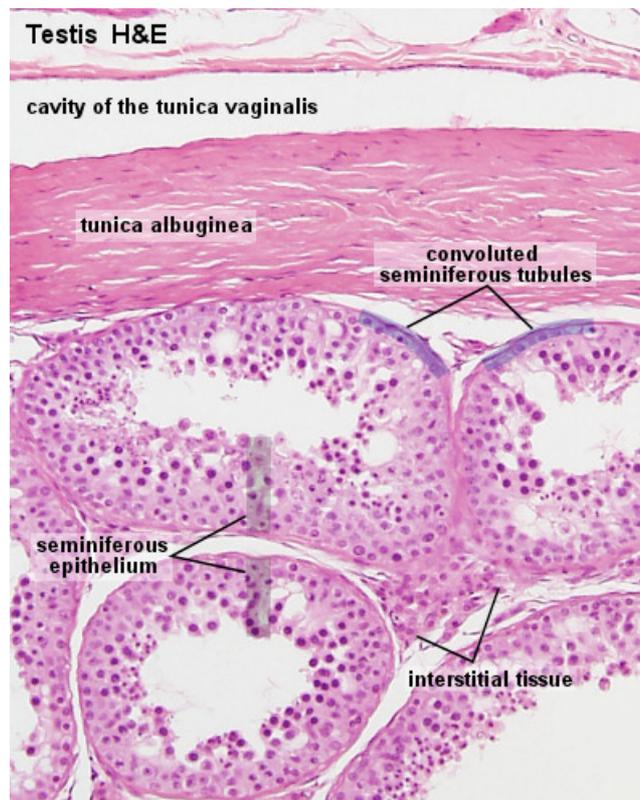


Fig. III.10 Section d'un testicule montrant les cordons séminifères.

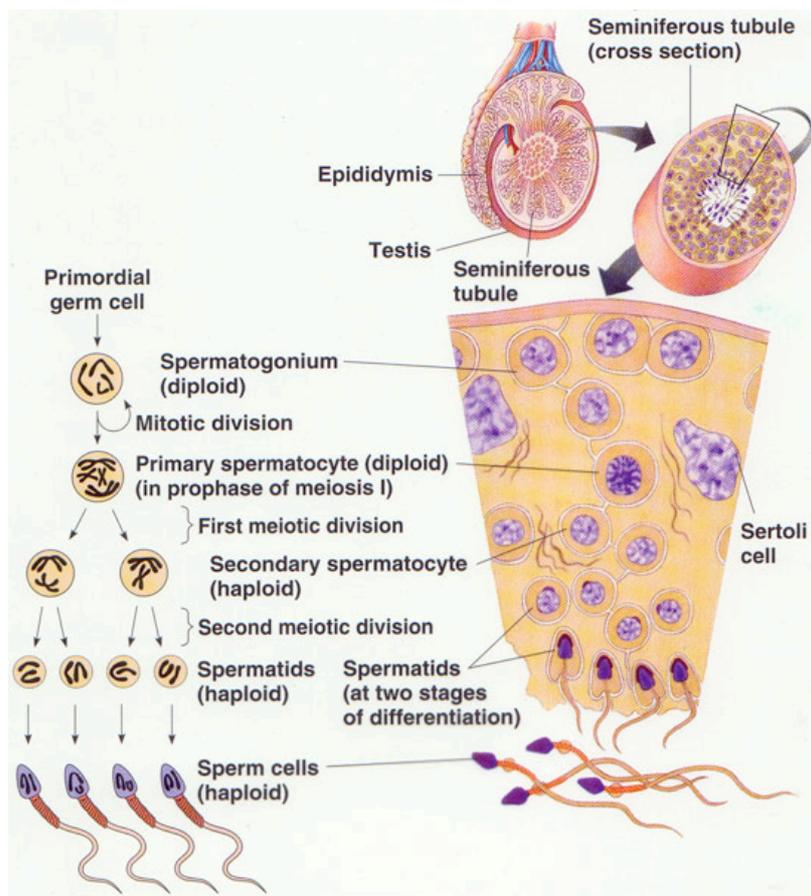
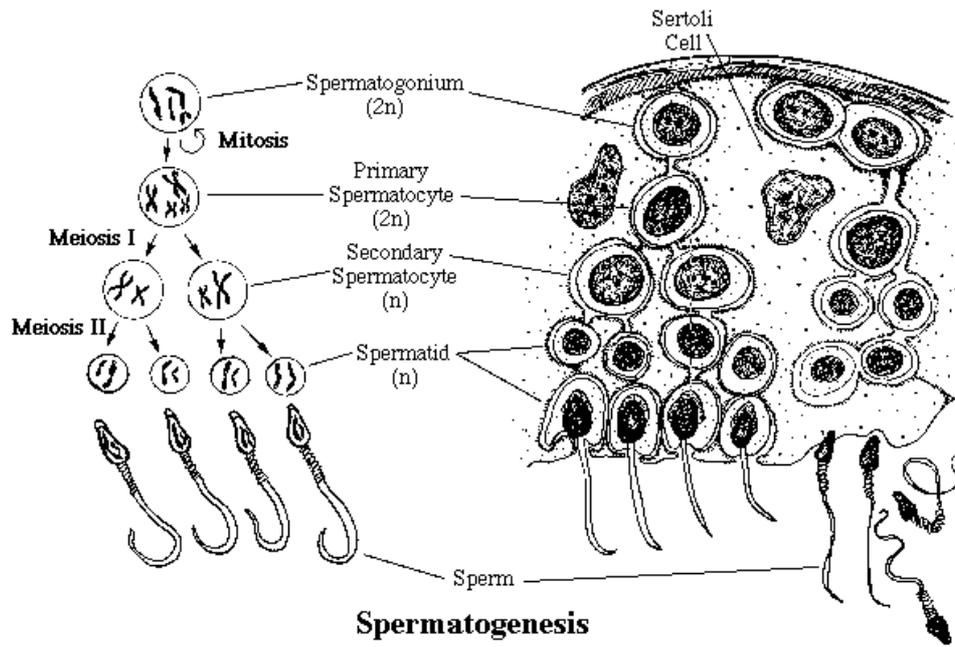


Fig. I.11 Représentations schématiques de la spermatogenèse au sein des cordons séminifères du testicule.

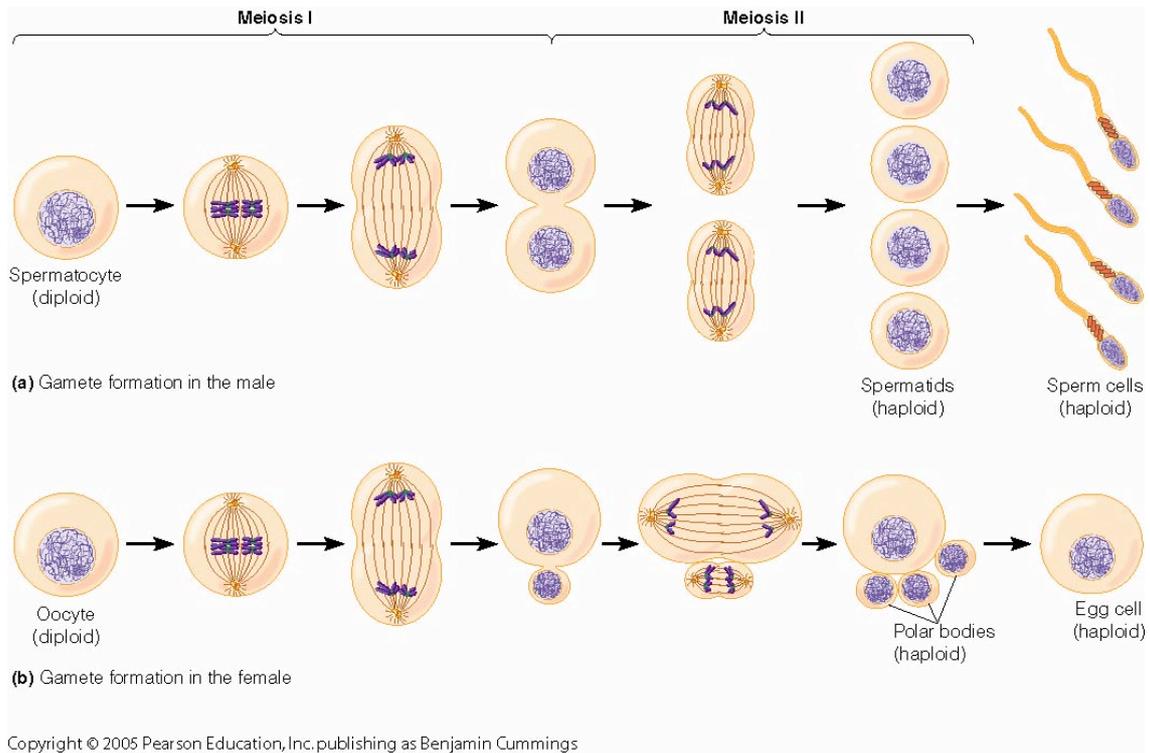


Fig. III.12 *Comparaison de la spermatogenèse et de l'ovogenèse : il est important de retenir aussi les temps très différents de la méiose dans la formation des gamètes mâles et femelles.*

## IV. Fécondation : la formation de l'embryon

La fécondation est une série de processus qui commence avec la pénétration de la *corona radiata* de l'ovocyte par le spermatozoïde et qui se termine avec la fusion des chromosomes de deux gamètes haploïdes. L'*embryon* est le résultat final de la fécondation.

### Pénétration de la corona radiata

La capacitation des spermatozoïdes résulte de l'élimination de facteurs inhibiteurs solubles présents dans la phase liquide du sperme.

Lorsque les spermatozoïdes capités rencontrent l'ovule dans la partie ampoulaire des trompes utérines, ils sont confrontés à la corona radiata et à certains résidus cellulaires du cumulus oophorus. La corona radiata est une couche cellulaire dotée d'une matrice interstitielle riche en protéines et en hydrates de carbone, en particulier de l'acide hyaluronique. L'hyaluronidase contenue dans l'acrosome des spermatozoïdes combinée à leurs mouvements flagellaires jouent un rôle important dans leur progression au sein de la corona radiata.

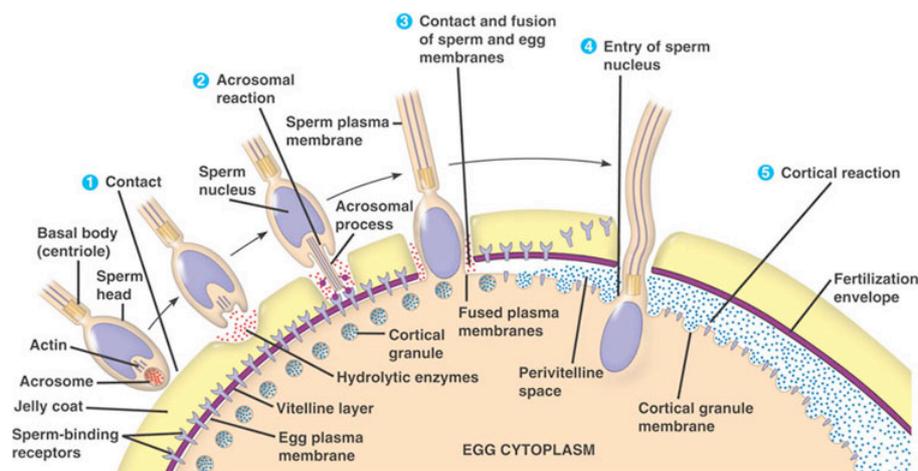


Fig. IV.1 Séquence des événements au cours de la réaction acrosomiale. Pénétration de la corona radiata, liaison à la zone pellucide et déclenchement de la réaction acrosomiale ; enfin liaison à la membrane plasmatique de l'ovule et pénétration dans l'ovocyte.

### Pénétration de la zone pellucide

La zone pellucide est épaisse d'environ 13  $\mu\text{m}$  et est composée essentiellement de glycoprotéines sulfatées. La zone pellucide entoure l'ovule puis l'embryon depuis l'ovulation jusqu'au moment de l'entrée dans la cavité utérine. Elle assure une série de fonctions essentielles:

- Induction de la réaction acrosomiale au moment de la fécondation.
- Seuls les gamètes mâles de la même espèce peuvent la franchir.
- Après la fécondation, elle se modifie pour empêcher la pénétration d'autres gamètes mâles et prévient donc toute *polyspermie*.
- Pendant les premières étapes de la segmentation, elle permet le passage de certains facteurs sécrétés par la trompe utérine.
- Elle prévient l'implantation trop précoce du zygote au niveau de la muqueuse de la trompe utérine (grossesse tubaire ou extra-utérine).
- Maintien des blastomères au cours des premières divisions de la segmentation.
- Barrière immunologique entre la mère et l'embryon qui présente une structure antigénique différente. La zone pellucide est en effet dépourvue des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) capables de présenter les antigènes embryonnaires aux cellules immunocompétentes de la mère. La zone pellucide contribue ainsi à la tolérance maternelle de l'embryon et empêche le rejet de l'allogreffe embryonnaire.

Trois glycoprotéines ont été identifiées dans la zone pellucide de l'ovocyte murin - ZP1, ZP2 et ZP3 - avec des poids moléculaires respectifs de 200, 120 et 83 kDa. ZP2 et ZP3 peuvent s'associer pour former de longs filaments polymériques.

L'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte est une réaction comparable à celle d'un ligand et de son récepteur. Des molécules situées à la tête du spermatozoïde se lient spécifiquement au niveau de la molécule ZP3, notamment au niveau de ses résidus glycosylés. Une de ces molécules serait l'enzyme galactosyl-transférase. Cette liaison induit la *réaction acrosomiale* du spermatozoïde. Celle-ci comporte une fusion des membranes plasmiques des gamètes et une exocytose des enzymes hydrolytiques contenues dans l'acrosome. L'enzyme principale de cette réaction est l'*acrosine*, une sérine protéase associée à la membrane interne de l'acrosome. Une fois que le spermatozoïde a effectué son trajet à travers la zone pellucide et dans l'espace

périvitellin (situé entre la membrane de l'ovule et la zone pellucide), il peut entrer en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte.

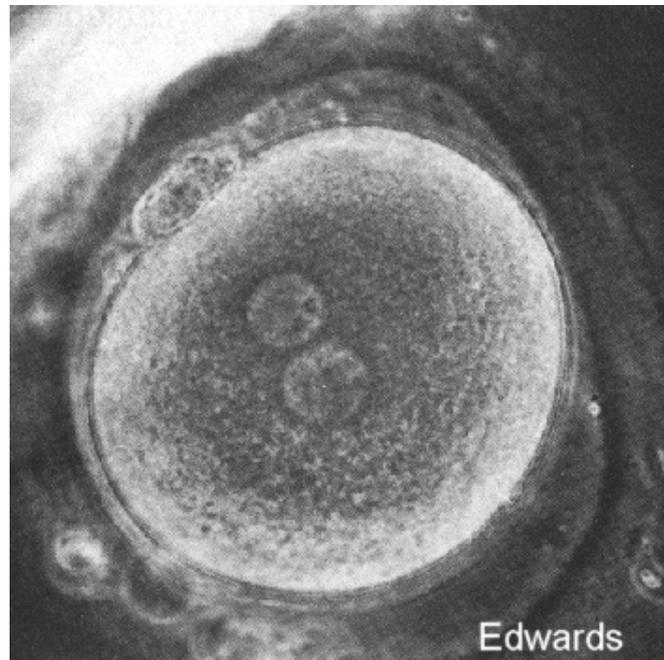


Fig. IV.2 *Fusion des membranes plasmiques du spermatozoïde et de l'ovule. Remarquer la reprise de la méiose au niveau du noyau de l'ovocyte.*

### **Fusion du spermatozoïde et de l'ovule**

La membrane plasmique du spermatozoïde, distincte sur le plan antigénique, est incorporée dans la membrane de l'ovocyte et il se forme une membrane mosaïque dont la composante mâle peut être reconnue au moins jusqu'au début de la segmentation de l'œuf. Bien que les mitochondries de la pièce intermédiaire du spermatozoïde pénètrent aussi, on ignore dans quelle mesure exacte elles contribueront au pool des mitochondries fonctionnelles du zygote.

Deux types de freins empêchent la pénétration d'autres spermatozoïdes (polyspermie).

- Le frein précoce (surtout étudié chez les oursins) est une dépolarisation électrique rapide de la membrane ovulaire. Le potentiel de repos passe de -70 mV à +10 mV dans les 2-3 secondes après la fusion des membranes plasmiques. Cette dépolarisation inhibe l'adhésion d'autres gamètes mâles à la membrane de l'ovocyte.

- Le frein tardif commence avec la propagation d'une onde de  $Ca^{++}$  depuis le site de fusion, à travers tout l'ovocyte. Cette onde induit la fusion des granules corticaux avec la membrane plasmique et la libération de leur contenu (enzymes hydrolytiques et polysaccharides) dans l'espace périvitellin. Ces enzymes attaquent les molécules ZP3 réceptrices, ce qui empêche également l'adhésion d'autres gamètes mâles. Cette réaction de la zone pellucide a été visualisée dans les œufs humains provenant d'une fécondation *in vitro* suivie de transfert d'embryon (FIV).

Suivant la pénétration du spermatozoïde, le noyau de l'ovocyte qui s'était arrêté à la métaphase de la deuxième division méiotique (métaphase II) complète cette dernière et le *second globule polaire* est libéré dans l'espace périvitellin. Les pronuclei mâle et femelle se rapprochent et, lorsqu'ils se rencontrent, leurs membranes disparaissent tandis que les chromosomes se mêlent. Cette fusion des pronuclei mâle et femelle s'appelle aussi *amphimixie*. Les chromosomes paternels et maternels s'organisent rapidement autour d'un fuseau en vue d'une division mitotique classique. La fécondation est terminée et son produit constitue alors l'*embryon* proprement dit (ou encore *œuf* ou *zygote*).

Seule, la fécondation permet à l'ovule de terminer sa seconde division méiotique. Elle restaure par ailleurs le nombre diploïde normal des chromosomes (46 dans l'espèce humaine). Enfin, le sexe de l'embryon est déterminé à ce moment par le complément venant du gamète mâle (22 autosomes et soit XX, soit XY). Par le réassortiment des chromosomes maternels et paternels, le zygote est un produit génétique unique et ceci est important pour la viabilité et la perpétuation de toute espèce. Enfin, la fécondation stimule l'activité métabolique de l'ovocyte ce qui est indispensable pour la segmentation précoce et le développement futur de l'embryon.

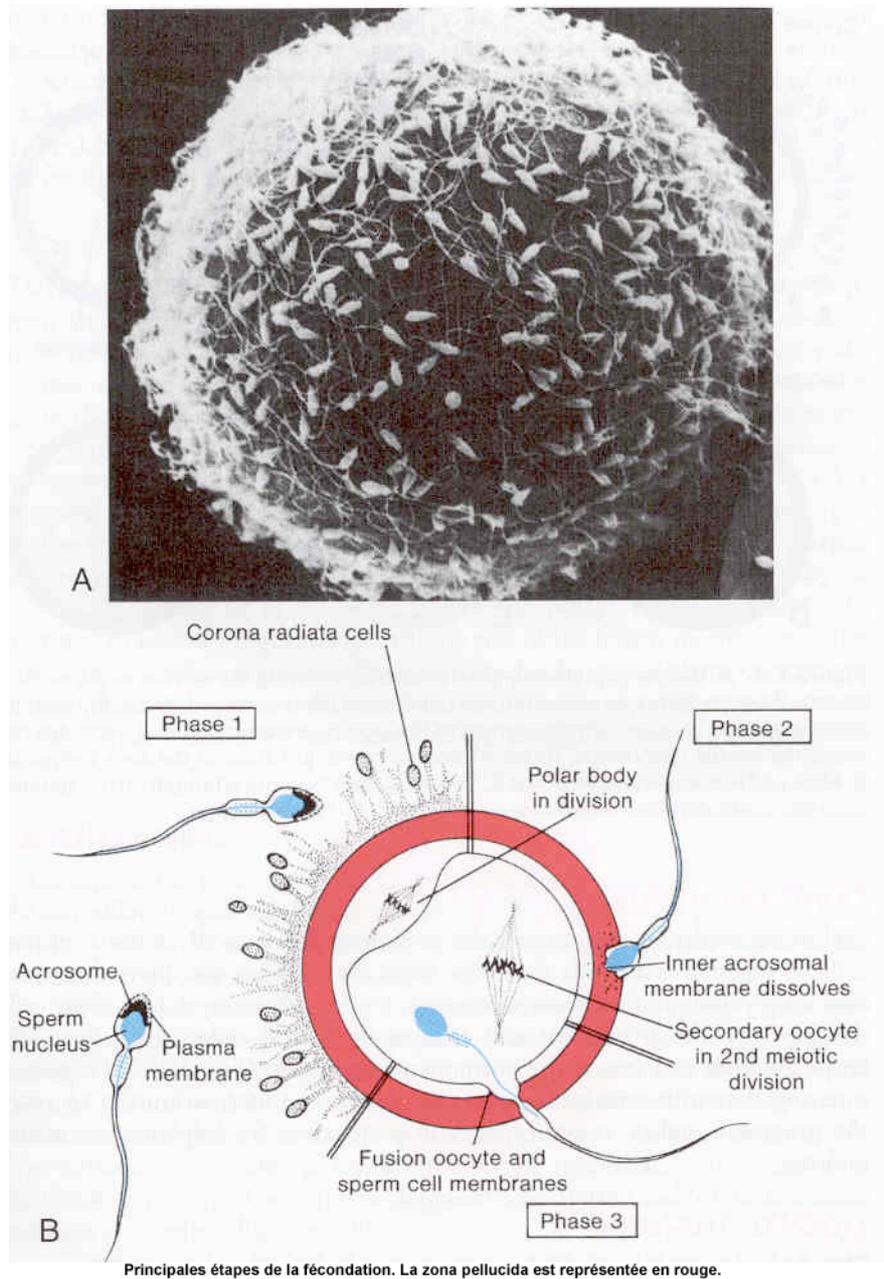


Fig. IV.3 Les grandes étapes de la fécondation

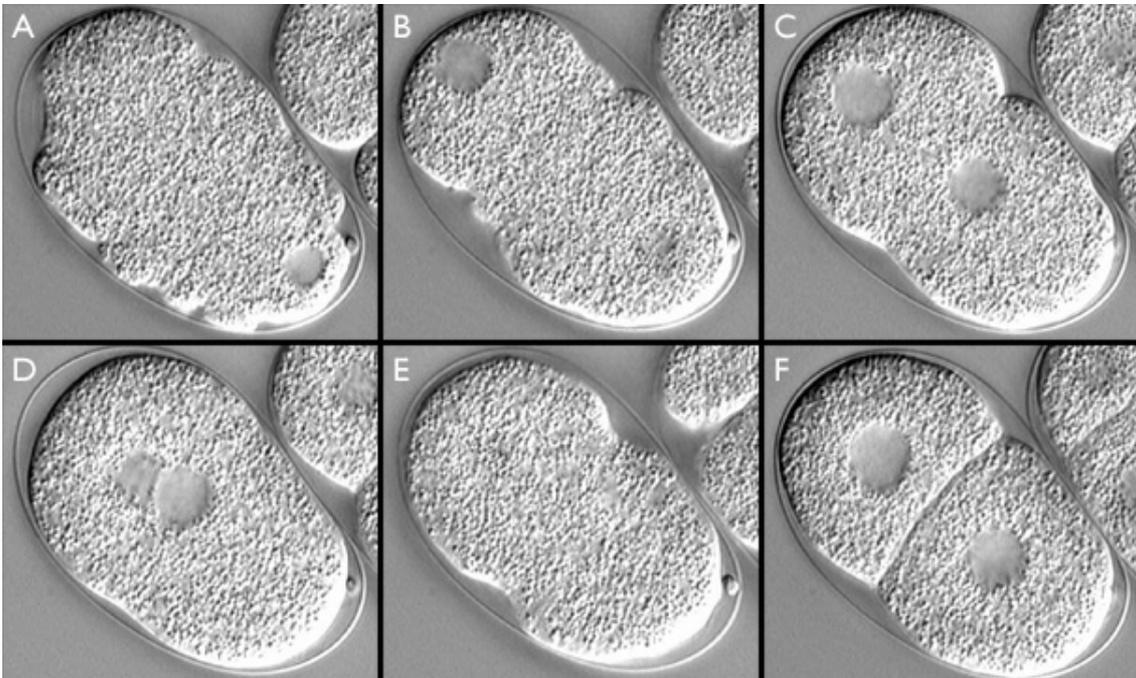
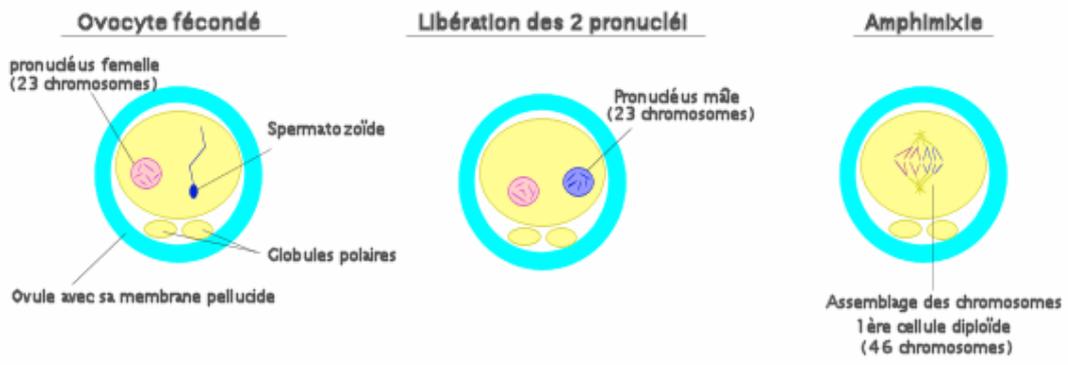


Fig. IV.4 Fusion de l'ovocyte et du spermatozoïde aboutissant à la fusion des noyaux ou amphimixie.

## V. *Segmentation précoce et implantation de l'embryon*

Parallèlement au développement intra-utérin et à la mise en place d'une connexion placentaire entre l'embryon et la mère, les mammifères (y compris les humains) ont acquis des modes de développement précoce très différents de ceux trouvés chez les invertébrés et les autres vertébrés. Chez ces derniers, l'œuf se développe à l'extérieur du corps et contient en conséquence tous les substrats énergétiques nécessaires pour un approvisionnement indépendant. Deux stratégies principales sont ainsi apparues au cours de l'évolution. L'une consiste en un développement précoce très rapide comme chez la drosophile, l'oursin et de nombreux amphibiens. Ceci implique un sac vitellin de taille modérée et une présynthèse de la machinerie moléculaire nécessaire pour le passage de l'embryon au stade de la gastrulation (voir chapitre suivant). Le développement de l'embryon chez ces espèces est donc très dépendant du génome maternel. L'autre stratégie adoptée par les oiseaux et les reptiles consiste en la production de très grands œufs contenant un sac vitellin de taille suffisante pour assurer un développement précoce à vitesse plus lente. Ceci élimine le besoin pour l'ovocyte de synthétiser et de mettre en réserve de grandes quantités d'ARN messagers et de ribosomes avant la fécondation. Chez les mammifères, l'interposition du placenta supprime pratiquement tout besoin de sac vitellin de grande taille et les œufs sont généralement très petits. Toutefois, le développement précoce est beaucoup plus lent et coïncide avec le délai nécessaire au zygote pour parcourir la trompe utérine depuis le site de la fécondation jusqu'à l'implantation au sein de l'utérus (environ 6 jours).

Dans les 24 heures qui suivent la fusion des pronuclei mâle et femelle (amphimixie), le zygote entame une série de divisions mitotiques (*segmentation*). Celles-ci ne s'accompagnent pas d'un accroissement de la taille cellulaire, et le zygote se divise en cellules filles plus petites appelées *blastomères*. L'embryon ne change pas de taille et demeure enchâssé dans la zone pellucide. La première division divise le zygote perpendiculairement à son plan équatorial et en ligne avec les globules polaires. La seconde division, complète 40 heures après la fécondation, produit quatre blastomères. Au jour 3, l'embryon comprend 8 à 16 cellules et au jour 4, il contient 16 à 32 cellules. A ce stade, il a alors l'apparence d'une petite mûre et est appelé *morula* (du latin *morum*, "mûre").

Dès le stade de 8 cellules, l'embryon subit une réorganisation appelée *compaction* impliquant l'activité des éléments du cytosquelette des différents blastomères. Des

phénomènes d'adhésion différentielle se mettent en place et aboutissent à la ségrégation de certaines cellules au centre de la morula (*masse cellulaire interne*) tandis que d'autres se placent en périphérie (*masse cellulaire externe*). La première constitue l'*embryoblaste* qui assurera le développement de l'embryon proprement dit; cette masse cellulaire interne constitue les fameuses cellules souches embryonnaires (ou ESC). La seconde composante cellulaire est la source première des membranes du placenta et est appelée *trophoblaste*. Des jonctions intercellulaires se mettent en place entre les cellules du trophoblaste.

Après 4 jours, la morula d'environ 32 cellules commence à se remplir d'un liquide. Celui-ci est d'abord absorbé par les vacuoles intracellulaires des blastomères puis se collecte entre eux. Une cavité ou *blastocèle* apparaît au sein de l'embryon. Les cellules de l'embryoblaste forment une entité compacte d'un côté de cette cavité, et les cellules du trophoblaste s'organisent sous forme d'un épithélium mince formé d'une seule couche. L'embryon forme alors un *blastocyste*.

## Segmentation de l'embryon humain (œuf alécithe)

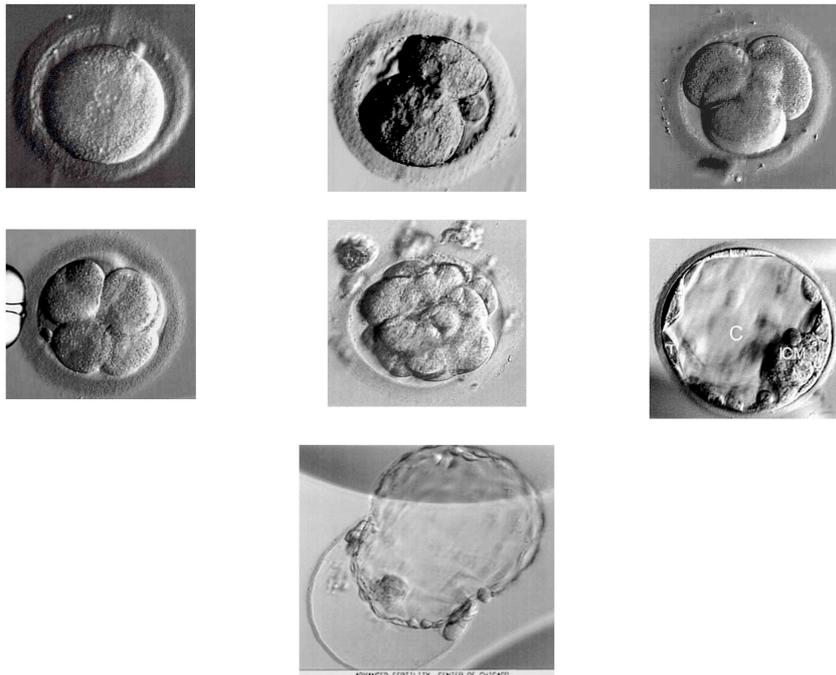


Fig. V.1 – *Les différents stades de la segmentation d'un embryon humain.*

De haut en bas et de droite à gauche :

- Fusion des pronuclei mâle et femelle (on note un globe polaire à 13h).
- 1<sup>ère</sup> division et formation de 2 cellules filles.
- 2<sup>ème</sup> division et formation de 4 cellules filles.
- 3<sup>ème</sup> division : 8 cellules filles.
- Stade de la *morula*.
- Stade du *blastocyste* : ICM = masse cellulaire interne (ESC) – C = blastocèle – T = trophoblaste.
- Stade de l'*éclosion* (« hatching ») du blastocyste hors de la capsule pellucide.

Au jour 5, le blastocyste quitte définitivement la zone pellucide suite à un processus de trypsinisation enzymatique et il peut interagir directement avec les cellules de l'endomètre utérin. Ces dernières réagissent à la présence du blastocyste et, sous l'influence de la progestérone sécrétée par le corps jaune ovarien, se différencient en cellules sécrétrices actives appelées *cellules déciduales*. Cette réaction déciduale implique aussi les glandes endométriales qui s'agrandissent, de même que la paroi utérine adjacente qui se vascularise et s'œdématie. Les sécrétions des cellules déciduales et des glandes endométriales contiennent divers facteurs de croissance qui assistent la croissance et l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine.

Le gène *Mash-2* joue un rôle essentiel dans l'apparition du trophoctoderme du blastocyste. Ce gène renferme l'information d'une protéine capable d'interagir avec le matériel d'ADN nucléaire pour contrôler l'expression de certains gènes (facteur protéique de transcription). Lorsque une extinction spécifique du gène *Mash-2* est réalisée par « knockout » chez la souris, les embryons meurent au 10ème jour par absence de développement placentaire.

Parmi les facteurs de croissance produits par les cellules endométriales et déciduales, le **leukemia inhibitory factor (LIF)** joue un rôle important. Il s'agit d'une protéine de 23 kDa riche en sucres (glycoprotéine), présentant de grandes ressemblances (homologie) entre les espèces animales et des ressemblances structurales (analogie) avec l'hormone de croissance. Le LIF est un agent de la communication intercellulaire et à ce titre peut être considéré comme une hormone (du grec *hormân*, stimuler ou exciter), ou encore une cytokine (du grec *kutos*, cellule, et *kinesis*, mouvement). Le nom de cette cytokine vient du fait qu'elle a été identifiée puis purifiée sur la base des propriétés différenciatrices que le LIF exerce sur des cellules cancéreuses lymphoblastiques. On sait aujourd'hui que cette cytokine peut être produite par différentes populations cellulaires et que ses actions sont pléiotropes. La **gonadotrophine chorionique (hCG)** produite par le trophoblaste induit la sécrétion active de LIF par les cellules endométriales. Cette sécrétion semble indispensable pour assurer l'implantation car les embryons de souris soumises à une extinction sélective (« knockout ») du gène *lif* sont incapables de s'implanter dans la paroi utérine.

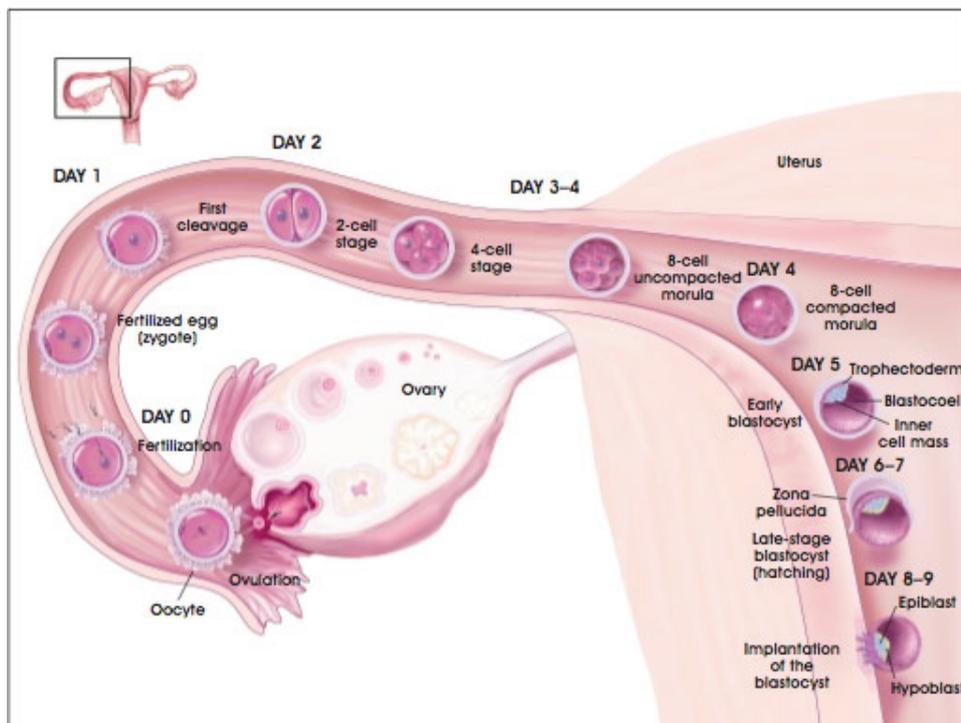


Fig. V.2 – Représentation schématique du trajet de l'embryon depuis la fécondation jusqu'à l'apposition du blastocyste à l'épithélium de l'endomètre utérin (début de l'implantation). Remarquer les différents stades de la segmentation de l'œuf et l'éclosion aux jours 6-7 après la fécondation.

Le premier stade de l'implantation consiste en une juxtaposition (apposition) du blastocyste et de l'endomètre utérin. La nature des facteurs chimiques intervenant dans cet attachement n'est pas connue avec précision mais ce phénomène implique certainement différentes *molécules d'adhésion*. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'attachement utérin du blastocyste s'effectue au niveau du trophoblaste situé en regard de la masse cellulaire interne (pôle embryonnaire ou animal). Ceci suggère que toutes les aires du trophoblaste ne possèdent pas la même identité fonctionnelle.

Le stade suivant est la pénétration de l'épithélium utérin par l'embryon. Les cellules dérivées du cytotrophoblaste en regard de la masse cellulaire interne (ou embryoblaste) fusionnent pour former un syncytium multinucléé, le *syncytiotrophoblaste*. Ce dernier constitue un tissu à pouvoir invasif important qui se développe rapidement et qui s'étend très vite tout autour du blastocyste. La nature biochimique de cette invasion de l'endomètre par le syncytiotrophoblaste n'est pas connue. La décidualisation des cellules stromales utérines voisines a comme première conséquence de fournir à l'embryon un site immunologiquement privilégié. *Cette absence de rejet et cette tolérance maternelle de l'allogreffe embryonnaire par la mère demeure un des grands mystères de la biologie du développement*. Néanmoins, les recherches menées dans de nombreux laboratoires au cours des dernières années ont permis d'identifier plusieurs mécanismes intervenant dans cette **tolérance maternelle** :

1. Nous avons déjà vu le rôle joué par la *membrane pellucide* qui, dépourvue de protéines dérivées du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou HLA chez l'homme), est incapable de présenter les antigènes embryonnaires au système immunitaire maternel. Cette tolérance passive persiste jusqu'au moment de l'éclosion blastocytaire.
2. La *gonadotrophine chorionique (hCG)* produite par le trophoblaste de l'embryon stimule non seulement la synthèse de LIF par l'épithélium de l'endomètre utérin, mais inhibe aussi la synthèse endométriale de l'interleukine 6 (IL-6), une cytokine activatrice et proinflammatoire du système immunitaire. Via l'hCG, l'embryon participe ainsi activement à son implantation et à sa tolérance par la mère.
3. Les cellules du syncytiotrophoblaste expriment des *protéines HLA de classe I particulières (HLA-G)*. Ces protéines sont capables d'inactiver l'activité

« tueuse naturelle » des cellules Natural Killer (NK) enrichies dans la decidua maternelle en début de grossesse (uNK).

4. Le *facteur de libération de la corticotrophine (CRF)* placentaire inhibe le système d'apoptose Fas/Fas Ligand à l'interface entre l'embryon et la mère.
5. Enfin, de plus en plus d'études montrent que des *cellules T suppressives* ou *régulatrices (Treg)*, présentes dans le stroma de l'utérus, pourraient aussi intervenir pour contrôler une activation du système immunitaire maternel contre l'allogreffe fœtale.

Au fur et à mesure que le syncytiotrophoblaste progresse dans la muqueuse utérine, il se met à éroder des vaisseaux sanguins maternels. Des lacunes sanguines se forment en son sein et, conjointement, son pouvoir invasif commence à s'estomper. C'est le début de la placentation ou formation du placenta (voir chapitre plus loin).

Les principales étapes de l'implantation de l'embryon humain sont représentées schématiquement à la Figure V.3.

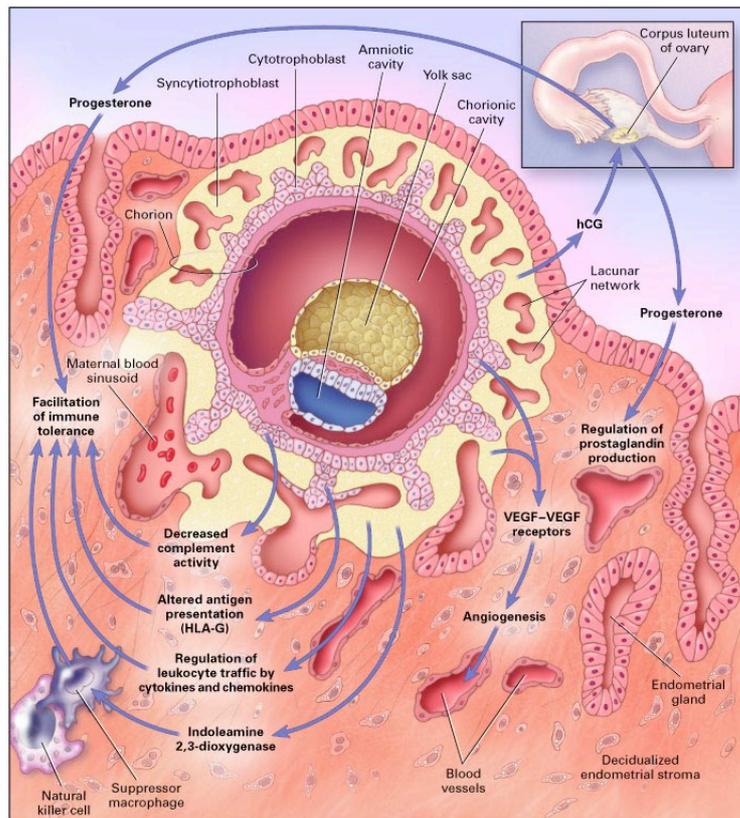
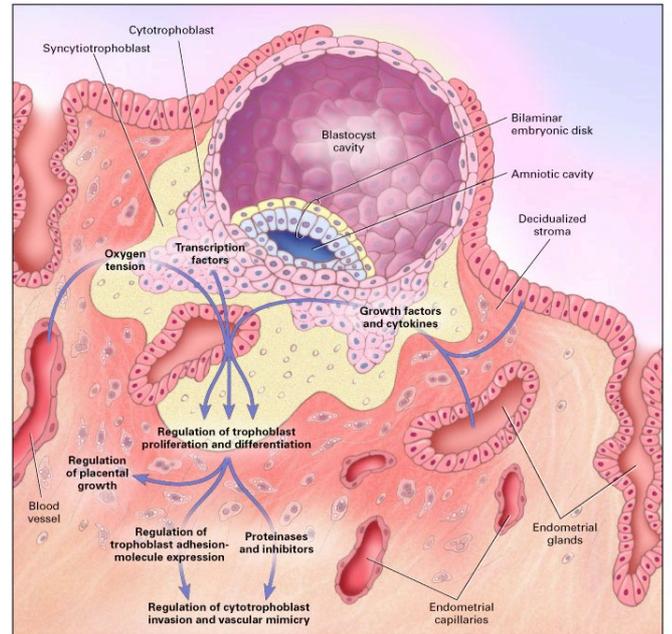
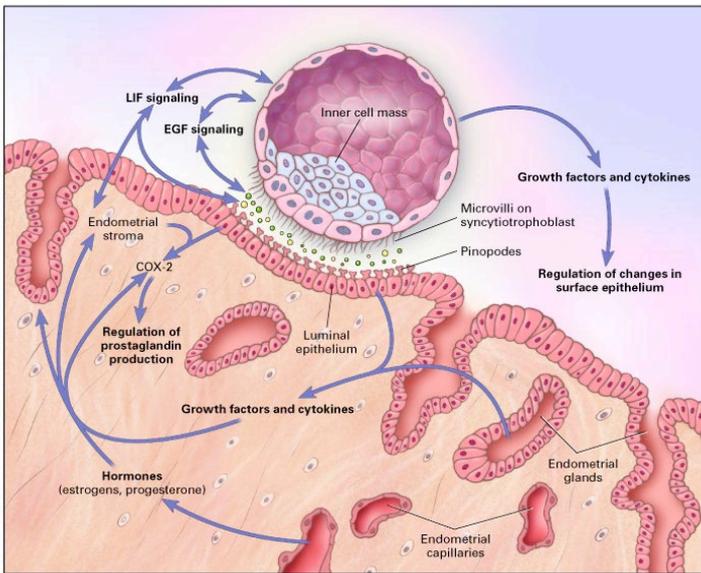


Fig. V.3 -

*Etapes principales de l'implantation.*

*A. Apposition du blastocyste et de l'endomètre utérin.*

*B. Invasion du syncytiotrophoblaste et apparition des premières lacunes.*

*C. Enfouissement (nidation) complète de l'embryon et début de la placentation.*

Observer aussi les modifications au sein du blastocyste. Une cavité apparaît au sein de la masse cellulaire interne, c'est la **cavité amniotique**.

Deux feuillettes peuvent être maintenant distingués : de hautes cellules au pôle animal (**épiblaste**), et des cellules plus allongées en-dessous (**hypoblaste**).

En l'absence d'embryon implanté, le corps jaune (*corpus luteum*) ovarien dégénère habituellement après 13 jours et se transforme en une cicatrice fibreuse blanchâtre (*corpus albicans*). La diminution de la sécrétion de progestérone qui s'ensuit est alors responsable de l'apparition des saignements menstruels chez la femme. Ces saignements correspondent en fait aux débris de l'endomètre utérin qui sont éliminés par la voie vaginale. Cependant, si un embryon s'implante, les cellules du trophoblaste se mettent à sécréter la **gonadotrophine chorionique (hCG)** (Fig. V.4). La cible d'action de l'HCG est le corps jaune qui, sous son influence, continue à sécréter des quantités croissantes de progestérone. Cette sécrétion se poursuit pendant les 11 à 12 premières semaines du développement embryonnaire. Après ce délai, c'est le placenta lui-même qui commence à assurer la sécrétion de quantités importantes de progestérone.

Parfois, l'embryon s'implante anormalement dans la cavité péritonéale, à la surface de l'ovaire, dans l'oviducte, ou dans une partie inhabituelle de l'utérus. Ces grossesses ectopiques (extra-utérines) représentent souvent une menace pour la vie de la mère car les vaisseaux néoformés au niveau de ces sites anormaux sont fragiles et peuvent se rompre à la suite de la croissance de l'embryon et du développement placentaire. La nature ectopique d'une grossesse peut se révéler par des signes cliniques comme des douleurs abdominales et/ou des saignements vaginaux. Une intervention chirurgicale est alors souvent nécessaire pour sauver la mère.

# Implantation

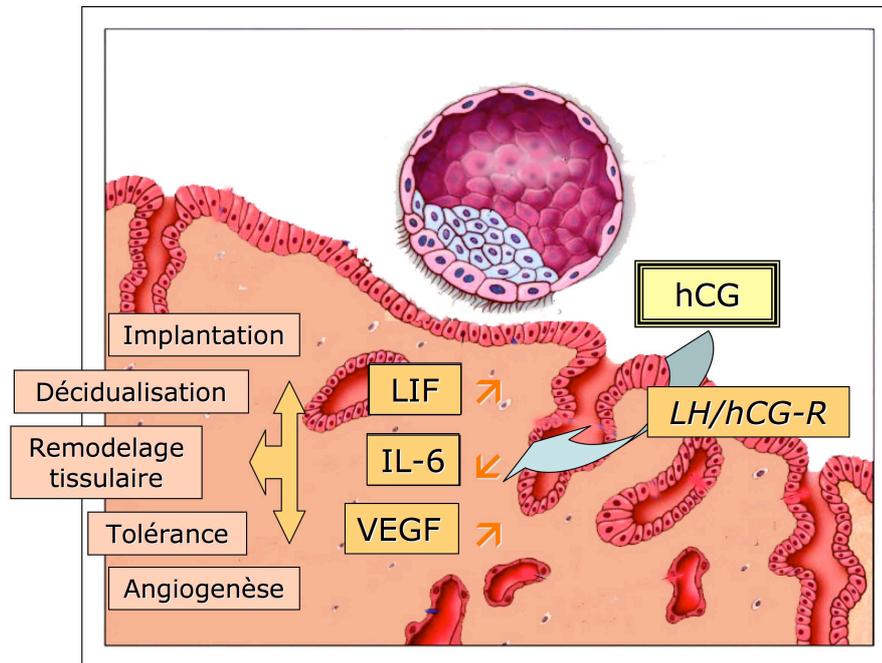


Fig. V.4 – Rôles locaux (paracrine) de l'hCG à l'interface fœto-maternelle :

1. Stimulation du LIF endométrial (cytokine proimplantatoire).
2. Inhibition de l'IL-6 endométrial, cytokine proinflammatoire (effet tolérogène).
3. Stimulation du VEGF endométrial, facteur angiogène (effet pro-placentation).

## Types de segmentation dans les espèces animales

L'importance du *vitellus* (mot latin signifiant jaune d'œuf) ou *lécithe* (du grec *lekithos*, jaune d'œuf) et le degré de sa ségrégation d'avec le cytoplasme pur contenant le noyau de fécondation déterminent l'emplacement possible des mitoses et la taille relative des blastomères.

Pour les œufs *alécithes*, pauvres en vitellus, la segmentation est égale et les blastomères sont sensiblement de la même taille. L'exemple typique d'un œuf alécithe est celui de l'œuf humain et des Mammifères exposé ci-dessus.

Pour les œufs *hétérolécithes*, où le vitellus est plus dense au pôle végétatif de l'œuf, du fait de ce gradient, les divisions cellulaires sont plus rapides au pôle animal qu'au pôle végétatif. La segmentation est alors inégale, avec des *macromères* au pôle végétatif et des *micromères* au pôle animal. Ce type de segmentation caractérise l'œuf des Amphibiens mais se rencontre aussi dans plusieurs groupes de Vertébrés aquatiques à caractère archaïques comme les Cyclostomes (Lamproies), les Poissons Chondrostéens (Esturgeons), Holostéens (Amie) et les Dipneustes (Protoptères).

Les œufs *télolécithes* (du grec *teleios*, complet, achevé) sont très chargés en vitellus et le noyau de fécondation s'est rassemblé en cape au-dessus du vitellus. La segmentation partielle ne se produit que dans le cytoplasme apical qui constitue le blastodisque tandis que la masse vitelline n'est pas pénétrée par les sillons de division. L'œuf est dit *méroblastique* (du grec *meros*, partie). La masse vitelline, grâce à la formation d'une annexe particulière, le sac vitellin, sera progressivement résorbée. Ce type de segmentation est celui des Poissons Elasmobranches et Téléostéens, et des Sauropsidés (Reptiles et Oiseaux).

### 1° Segmentation des œufs hétérolécithes (Fig. V.5)

Exemple de l'œuf d'amphibien

Une rotation de 30° du cytoplasme sous-cortical permet de localiser la future ligne médio-dorsale de l'embryon. Cette rotation entraîne un peu de pigment cortical dans une zone de l'hémisphère végétatif qui en était dépourvue et il se forme ainsi un *croissant gris* matérialisant la future région dorsale de l'embryon. Le déplacement du cytoplasme sous-cortical est désigné comme *rotation de symétrisation*.

Après 13 à 14 cycles cellulaires (soit une trentaine d'heures après la fécondation), la blastula compte de 13 à 15 mille blastomères et va entrer en gastrulation. Les macromères du pôle végétatif se distinguent aisément des micromères du pôle animal.

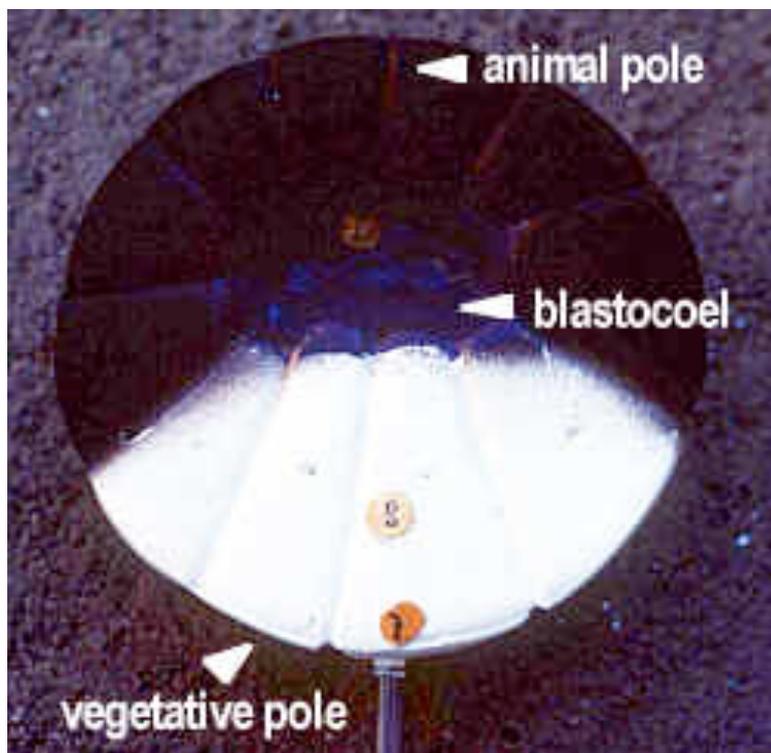
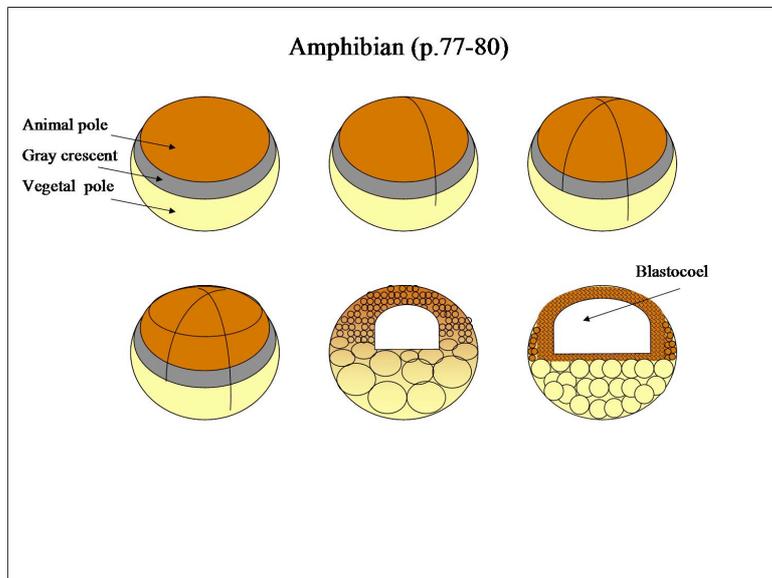


Fig. V.5 - *Segmentation de l'œuf d'amphibien*  
Observer la formation du croissant gris suite à la rotation de symétrisation (30°) de la calotte pigmentaire vers le point d'entrée du spermatozoïde.

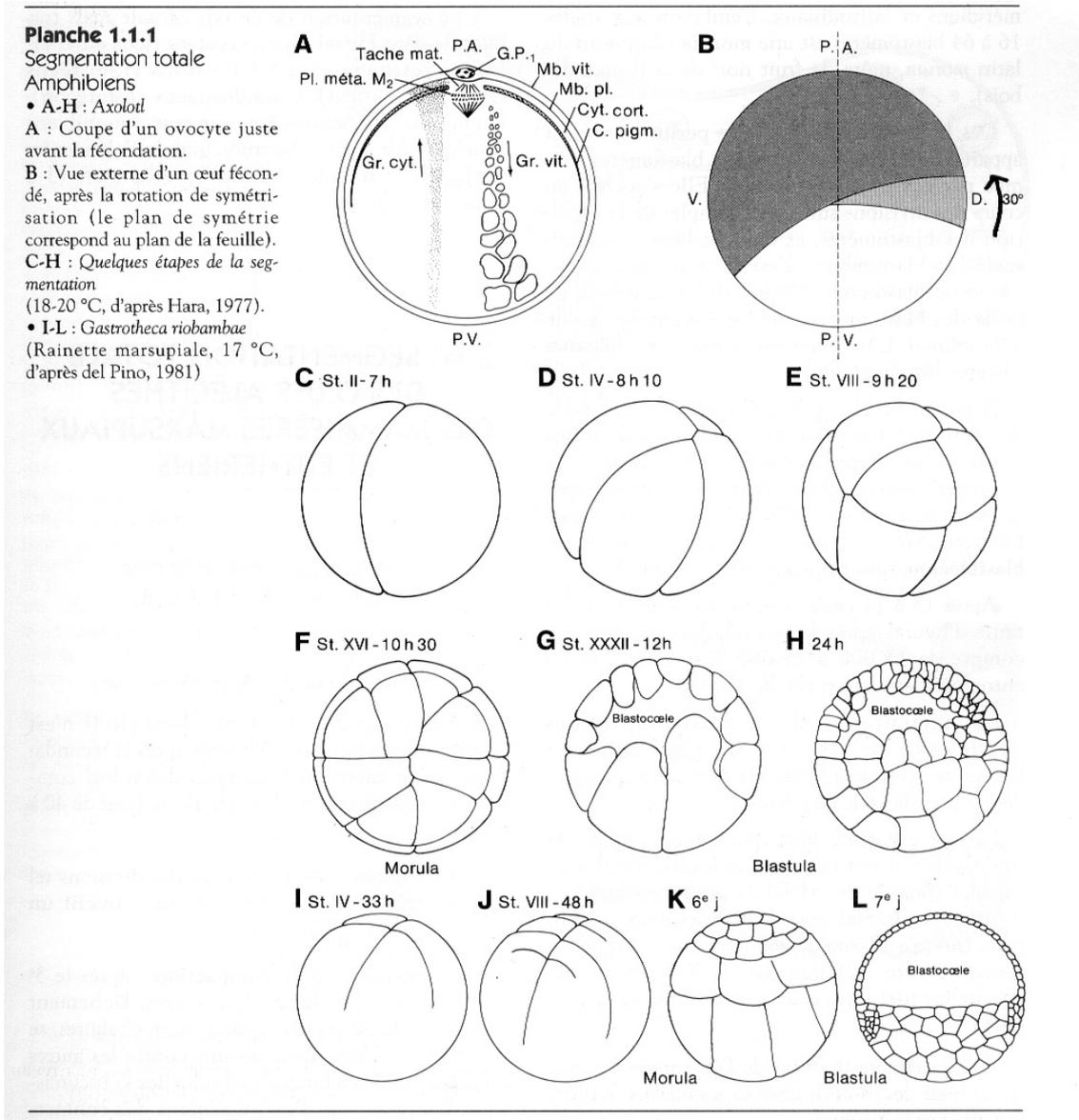


Fig. V.6 - *Segmentation totale d'œufs hétérolécithes (Amphibien).*  
 Remarquer aussi la différence de cinétique des premières divisions entre l'œuf d'Axolotl et celui de la Rainette marsupiale.

## 2. Segmentation partielle discoïdale des œufs téléolécithes (Fig. V.7)

### a) Exemple de l'œuf d'Oiseau (Fig. V.7 A-F)

La segmentation n'intéresse que le disque germinatif qui coiffe l'énorme masse de vitellus. La segmentation est rapidement *irrégulière* et *asynchrone* dès le troisième clivage. La totalité du disque germinatif est segmentée 15 à 17 heures après la fécondation et le blastoderme est alors composé de 3 à 4 couches de blastomères. Au moment de la ponte de l'œuf, une aire pellucide apparaît au centre du blastoderme résultant d'un amincissement de ce dernier. Ceci est la première indication de la polarité antéro-postérieure de l'embryon acquise au cours des 10 premières heures (peut-être sous l'influence de la gravité). Cette aire pellucide est entourée d'une aire opaque plus épaisse restée au contact du vitellus.

### b) Exemple de l'œuf des Poissons Téléostéens (Fig. V.7 G-L)

Les œufs sont entourés par un chorion acellulaire épais, formant une enveloppe protectrice pourvue d'un micropyle au niveau du pôle animal de l'ovocyte en métaphase II. Le micropyle permet le passage d'un spermatozoïde dépourvu d'acrosome. La segmentation partielle et discoïdale du zygote ne concerne que le blastodisque. Au 10<sup>ème</sup> cycle, certaines cellules marginales du disque fusionnent avec le vitellus et forment le *syncitium vitellin*.

Le blastoderme est alors composé:

- d'une couche enveloppante unistratifiée de cellules serrées;
- d'une couche syncitiale ou périlaste;
- de blastomères profonds, dispersés entre ces deux couches, en contact étroit à la marge du blastoderme.

La couche enveloppante et le syncitium sont des structures extra-embryonnaires spécifiques des Téléostéens. La couche enveloppante formera le périderme externe, protecteur, qui disparaîtra ultérieurement, tout comme le syncitium vitellin, après la résorption du vitellus dans laquelle il joue un rôle fondamental.

Chez la blastula "âgée", un mouvement rapide d'*épibolie* se traduit par le déploiement et l'amincissement du blastoderme qui recouvre progressivement le vitellus.

**Planche 1.1.3**

**Segmentation partielle discoïdale**

• A-F : Poule

A-D : Disque germinatif en vue polaire.

E-F : Coupes sagittales de blastulas montrant la formation de la cavité sous-germinale (C.S.G.) entre le blastoderme (Bl.) et le vitellus (V.) et des aires opaques (A.O.) et pellucides (A.P.)

• G-L : Téléostéens

G : Œuf ovulé de *Medaka* (diamètre : 1,2 mm).

F-L : *Poisson-Zèbre*

Le disque germinatif est elliptique ; le premier plan de clivage (↓) passe par le petit axe de l'ellipse, le second correspond au plan de la page.

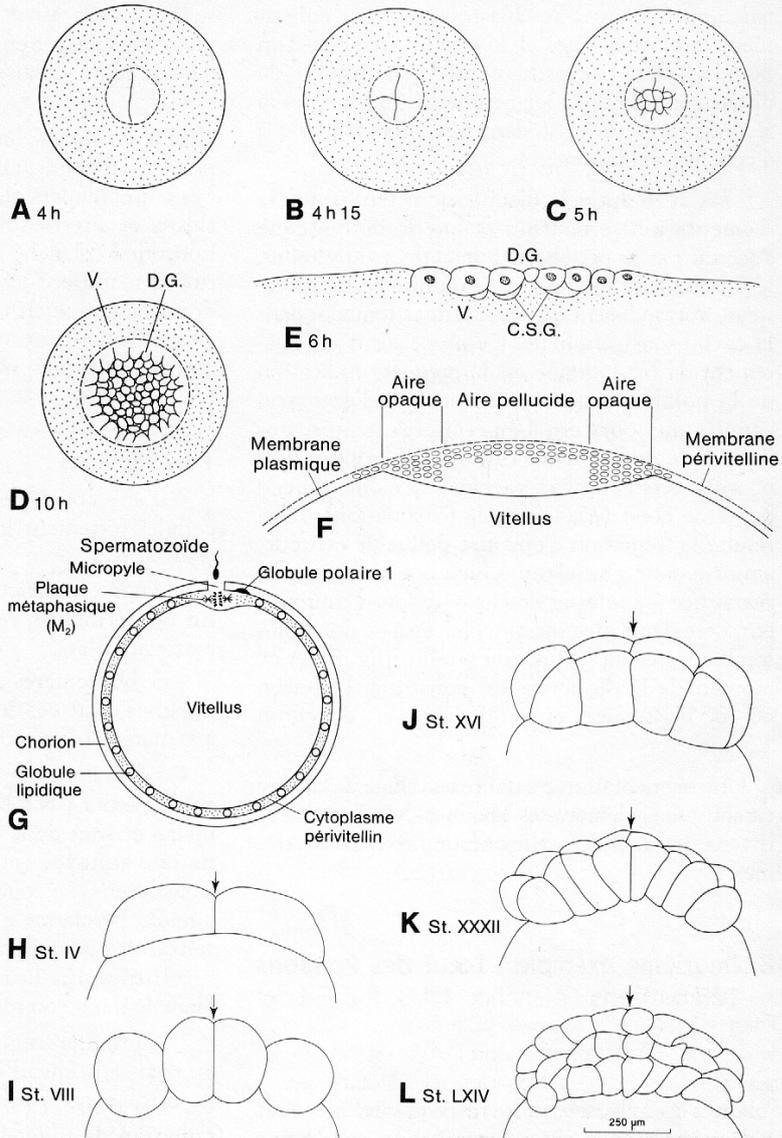


Fig. V.7 - *Segmentation partielle et discoïdale d'œufs télolécithes (Poule et Poisson-zèbre)*

## ***VI. Plan de base de l'embryon: la gastrulation***

### **Le disque embryonnaire à deux feuillets (2ème semaine)**

L'organisation de l'embryon se modifie entièrement au fur et à mesure de son implantation dans la paroi utérine. La masse cellulaire interne se dispose en deux feuillets. La couche supérieure ou *épiblaste* est formée de grandes cellules polyédriques; elle est destinée à former tous les tissus de l'embryon et l'épithélium amniotique. La couche inférieure (*hypoblaste* ou endoderme primitif) comprend une couche de cellules épithéliales plus fines. Les données de l'embryologie comparative suggèrent que l'hypoblaste se forme par *séparation* (ou *délamination*) à partir de la masse cellulaire interne. L'hypoblaste ventral formera plus tard la paroi du lécithocèle (entoblaste extraembryonnaire). La masse cellulaire interne a maintenant la forme d'un disque à deux feuillets dont l'épiblaste occupe la surface dorsale et l'hypoblaste la surface ventrale.

Un phénomène de *cavitation* se produit à l'intérieur de l'épiblaste et la cavité amniotique apparaît progressivement. Dans le même temps, les cellules de l'hypoblaste se répartissent en une couche disposée le long de la surface interne du cytotrophoblaste, l'*endoderme pariétal*. Lorsque les cellules se rejoignent de part et d'autre, une vésicule appelée *lécithocèle primitif* apparaît. A ce stade ( $\pm 8$  jours après la fécondation), le complexe embryonnaire consiste en un disque à deux feuillets qui se trouve entre le lécithocèle ventral et la cavité amniotique dorsale (Fig. VI.1).

Au 9ème jour, un autre tissu, le *mésoderme extraembryonnaire*, se forme à partir de la transformation des cellules de l'endoderme pariétal (et non pas comme il était admis classiquement à partir du trophoblaste). Ce mésoderme va servir de tissu de soutien pour l'épithélium de l'amnios, du lécithocèle, et des villosités chorales qui se forment au sein des tissus trophoblastiques. Ce soutien est non seulement mécanique mais aussi trophique puisque c'est à travers le mésoderme que passent les vaisseaux sanguins qui approvisionneront les différents épithéliums en oxygène et en divers éléments nutritifs.

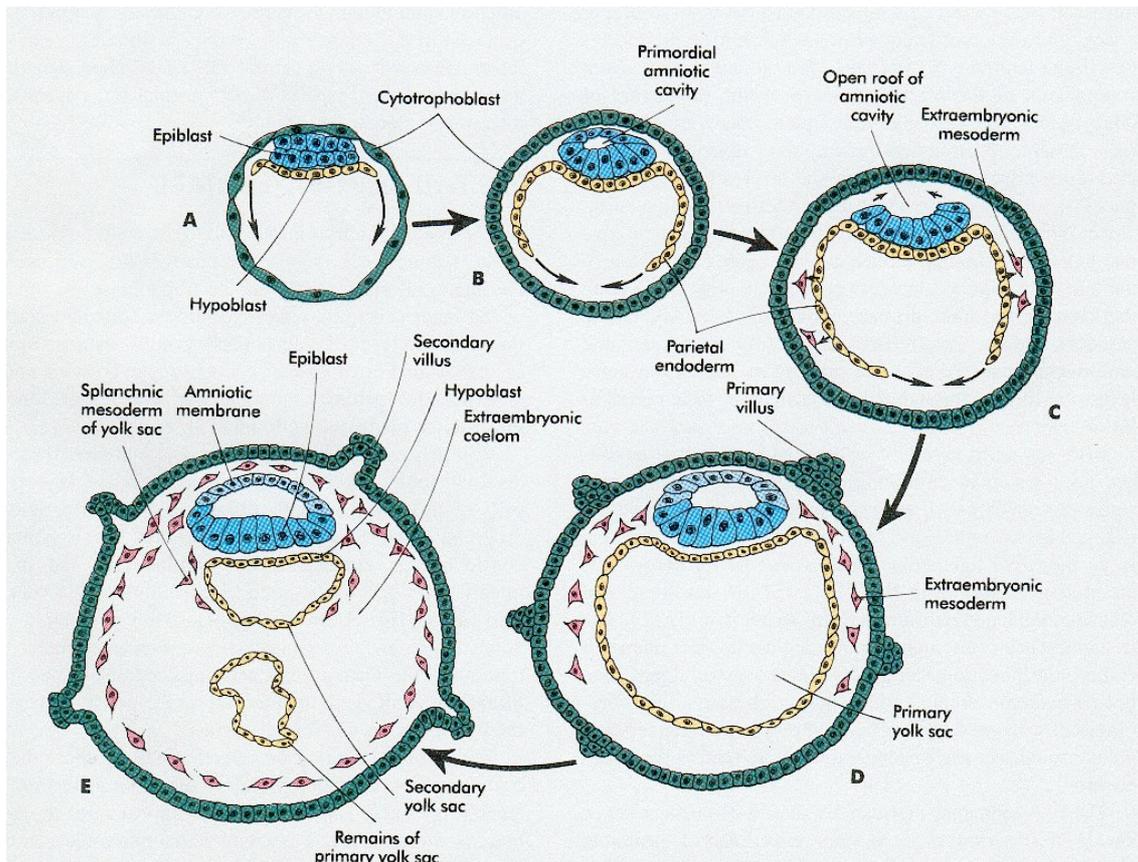


Fig. VI.1 - *Origine des principaux tissus extraembryonnaires et formation du disque embryonnaire à deux couches.* **A**, Début de l'implantation. **B**, blastocyste implanté à 7 1/2 jours. **C**, blastocyste implanté à 8 jours. **D**, embryon de 9 jours. **E**, début de la troisième semaine.

### Mise en place des trois feuilletts embryonnaires: la gastrulation

*"It is not birth, marriage, or death, but gastrulation, which is truly the most important time in your life."*

**Lewis WOLPERT (1986)**

Au début de la troisième semaine (jour 15), l'embryon entame la *gastrulation* pendant laquelle les trois feuilletts embryonnaires deviennent clairement établis. Les cellules qui formeront les organes endodermiques et mésodermiques sont amenées à l'intérieur de l'embryon. Les cellules qui formeront la peau et le système nerveux s'étalent au niveau de la surface embryonnaire externe. La morphologie de la gastrulation humaine suit l'allure générale du même processus chez les Oiseaux et chez les Reptiles (œufs télolécithes). Bien que la gastrulation puisse varier selon les espèces

considérées, les mécanismes fondamentaux sont relativement peu nombreux et identiques pour les différentes espèces. Parmi ceux-ci, on distingue généralement les principaux types de mouvements cellulaires suivants:

- *Epibolie* (du grec *epibolé*, superposition) ou étalement en nappe de feuillet épithéliaux à la surface de l'embryon, recouvrant les territoires profonds.
- *Invagination* de territoires superficiels qui s'enfoncent à l'intérieur de l'embryon.
- *Involution* ou enroulement de territoires superficiels qui se réfléchissent sur eux-mêmes au niveau d'un point d'enroulement (comme un tapis roulant).
- *Polyingression* de cellules qui se détachent individuellement ou en petits groupes d'un territoire superficiel.
- *Délamination* ou *séparation* d'une couche de cellules en deux ou plusieurs feuillets parallèles.
- *Migration* active de cellules individuelles ou en nappes.

**Tous les feuillets embryonnaires proviennent de l'épiblaste** à la surface dorsale duquel apparaît un épaississement, puis une *ligne primitive*. Celle-ci est une condensation causée par la convergence en cette zone de cellules épiblastiques. En même temps que la ligne primitive, les axes antéro-postérieur (cranio-caudal) et droit-gauche de l'embryon s'identifient maintenant aisément (Fig. VI.2). Les axes fondamentaux du corps s'établissent donc précocément au début de la troisième semaine de la vie fœtale.

Une dynamique cellulaire sophistiquée accompagne l'installation de la ligne primitive. Les cellules épiblastiques qui l'atteignent changent de forme et migrent sous cette ligne pour former de nouvelles couches disposées ventralement par rapport à l'épiblaste superficiel. Il s'agit donc d'un mélange d'invagination, d'involution et de polyingression. La *fente primitive* apparaît alors au milieu de la ligne du même nom. A son extrémité antérieure, une accumulation localisée de cellules forme le *nœud de Hensen*. Celui-ci revêt une importance fondamentale parce que c'est à travers cette zone que les cellules de l'épiblaste vont migrer pour ensuite être canalisées en une masse allongée de cellules mésenchymateuses, la *chorde* ou *prolongement céphalique*.

Cette migration des cellules épiblastiques s'accompagne d'une modification radicale de leur morphologie: de cellules épithéliales au niveau de l'épiblaste, elles deviennent des cellules mésenchymateuses au sein de la chorde. Il existe une analogie fonctionnelle importante entre le nœud de Hensen et la lèvre dorsale du blastopore des embryons d'Amphibiens. Comme le chordo-mésoderme qui migre à travers la lèvre dorsale sous l'ectoderme chez les Amphibiens, la chorde des Mammifères jouera un rôle primordial dans l'induction du système nerveux de l'embryon. Les cellules du nœud de Hensen synthétisent de l'*acide rétinolique*, une molécule-signal au pouvoir morphogène très important.

Chez les Oiseaux, les premières cellules épiblastiques qui quittent la ligne primitive entrent au niveau de l'hypoblaste, déplaçant certaines cellules de l'endoderme extraembryonnaire pour former l'endoderme embryonnaire définitif. Cette origine épiblastique de l'endoderme n'a pas été confirmée expérimentalement chez l'embryon humain, mais l'évolution morphologique de la gastrulation humaine est compatible avec l'existence d'un phénomène identique à celui observé chez les Oiseaux.

La formation des mésodermes embryonnaire et extraembryonnaire est le point fondamental de la gastrulation humaine. L'analyse biochimique des signaux intervenant dans l'induction du mésoderme sera d'ailleurs examinée en détail plus loin. En plus de s'étendre entre le trophoblaste et autour du lécithocèle, une masse de cellules du mésoderme extraembryonnaire forme le *pédicule de fixation* entre l'embryon et le *chorion* (combinaison du trophoblaste et du mésoderme extraembryonnaire sous-jacent). Ce pédicule de fixation deviendra par après le *cordon ombilical*. L'étude des membranes extraembryonnaires sera examinée en détail dans un chapitre ultérieur.

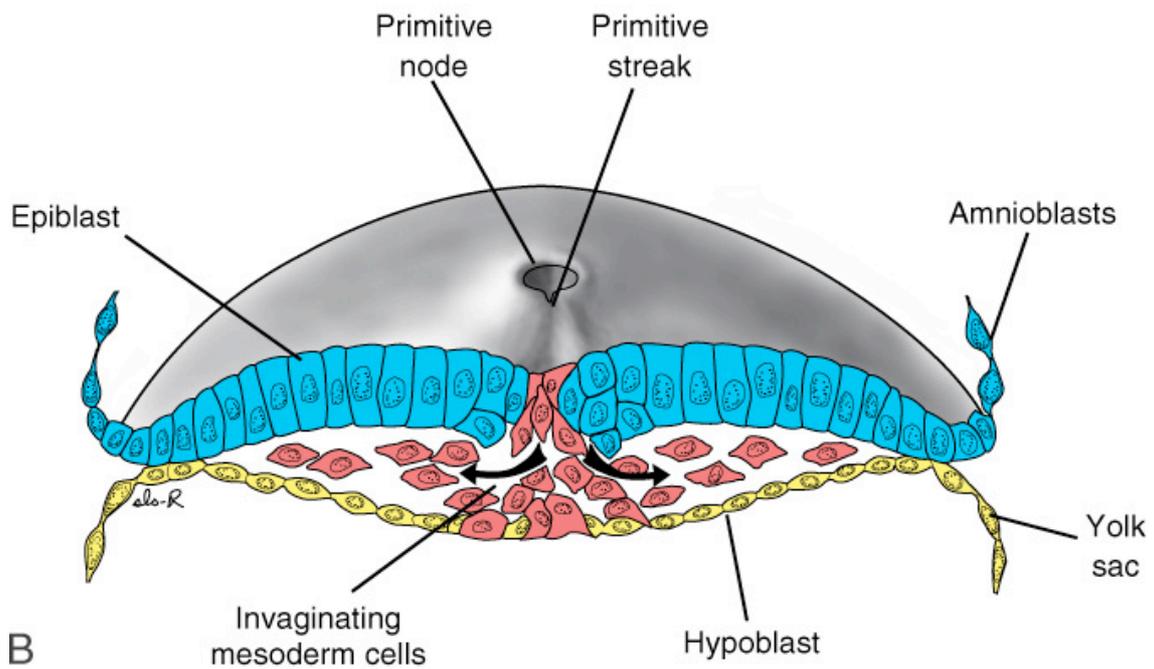
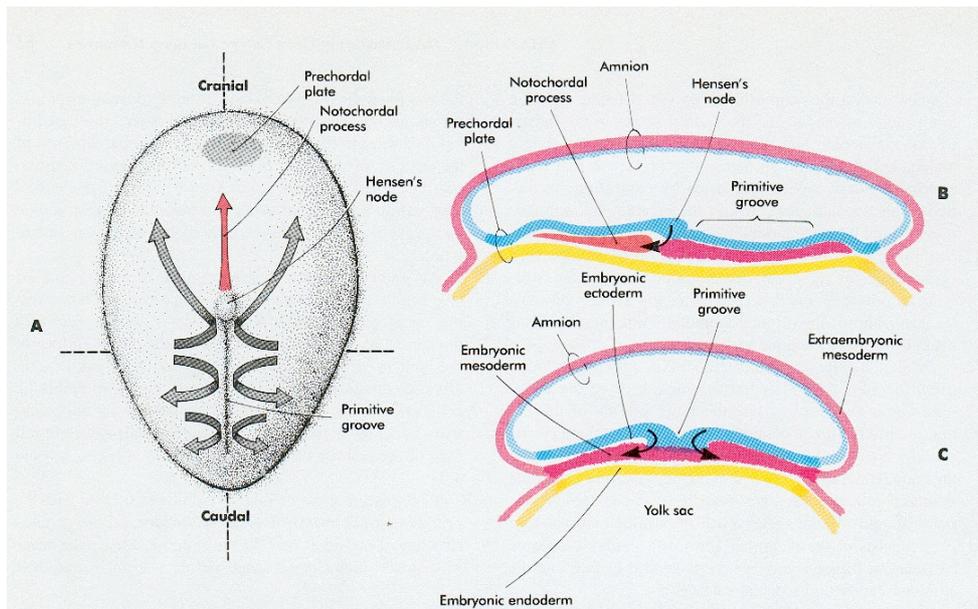


Fig. VI.2 - Gastrulation de l'embryon humain. Les flèches indiquent la direction des mouvements cellulaires à la surface de l'épiblaste vers la ligne primitive, à travers celle-ci, et en s'écartant de celle-ci comme mésoderme nouvellement formé.

D'un point de vue biochimique, les cellules de l'épiblaste produisent de l'**acide hyaluronique**, un polymère formé de la répétition de sous-unités d'acide glucuronique et de *N*-acétylglucosamine. Cet acide est souvent associé aux phénomènes de migration cellulaire dans les systèmes de développement. Cette molécule peut lier de l'eau (jusqu'à 1000 fois son propre volume) et elle semble empêcher l'agrégation des cellules mésenchymateuses au cours des migrations cellulaires. En effet, si de l'hyaluronidase est injectée dans le blastocèle, les cellules mésenchymateuses s'agglutinent et ne peuvent migrer correctement.

D'autres molécules sont indispensables pour l'extension et surtout l'orientation des cellules du mésoderme depuis la ligne primitive, comme la **fibronectine** (et probablement la laminine). Peu de temps avant la gastrulation, l'ectoderme présomptif situé au toit du blastocèle sécrète une matrice extracellulaire riche en fibrilles de fibronectine. Les cellules du mésoderme qui involuent semblent se déplacer le long de ces fibrilles. Les cellules se lient au niveau d'une séquence particulière de trois acides aminés (Arg-Gly-Asp ou RGD) de la fibronectine. Si on injecte de grandes quantités de ce tripeptide dans le blastocèle de salamandre juste avant la gastrulation, les cellules du mésoderme ne peuvent trouver leur chemin et leur involution stoppe (travaux de Boucaut et de Thiéry). Cette migration du mésoderme peut également être freinée par des anticorps dirigés contre la fibronectine ou contre la molécule d'adhésion **intégrine  $\beta_1$**  qui lie la fibronectine à la surface cellulaire où elle est ancrée.

Entre le 18<sup>ème</sup> et le 19<sup>ème</sup> jour, la corde se glisse en avant entre l'hypoblaste et l'épiblaste pour constituer le prolongement céphalique (Fig. IV.3). Celui-ci ne se présente pas sous la forme d'un cordon plein comme chez les Oiseaux mais sous forme d'un tube ouvert au niveau de nœud de Hensen: la *canal chordal* ou *neurentérique*. Une fissuration du plancher de ce canal et du toit du lécithocèle permet l'étalement du canal en une *plaque chordale* qui s'incorpore au toit du lécithocèle dont elle s'isolera ultérieurement. A partir du jour 20, le nœud de Hensen recule, la ligne primitive se raccourcit et le prolongement céphalique s'allonge. La gastrulation s'achève au 22-23<sup>ème</sup> jour avec la disparition de la ligne primitive et du nœud de Hensen. Tant du point de vue phylogénique qu'ontogénique, la ligne primitive puis la corde servent de support longitudinal pour l'établissement du plan de base de l'embryon. De plus chez les Vertébrés les plus récents, le mésoderme chordal joue le rôle d'un inducteur fondamental de l'embryon, en particulier dans la transformation de parties de l'ectoderme embryonnaire en éléments du système nerveux pendant la neurulation.

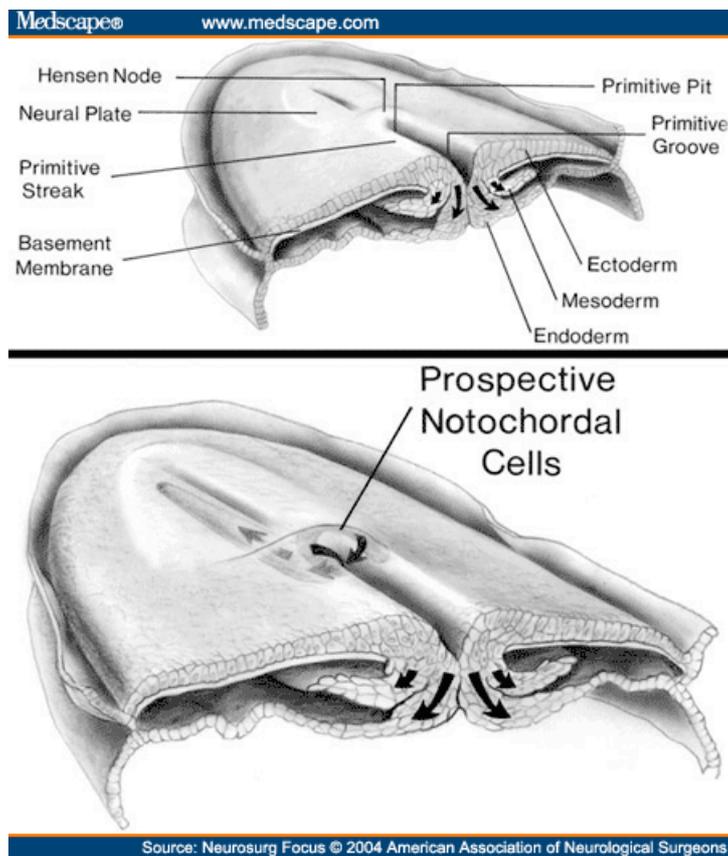
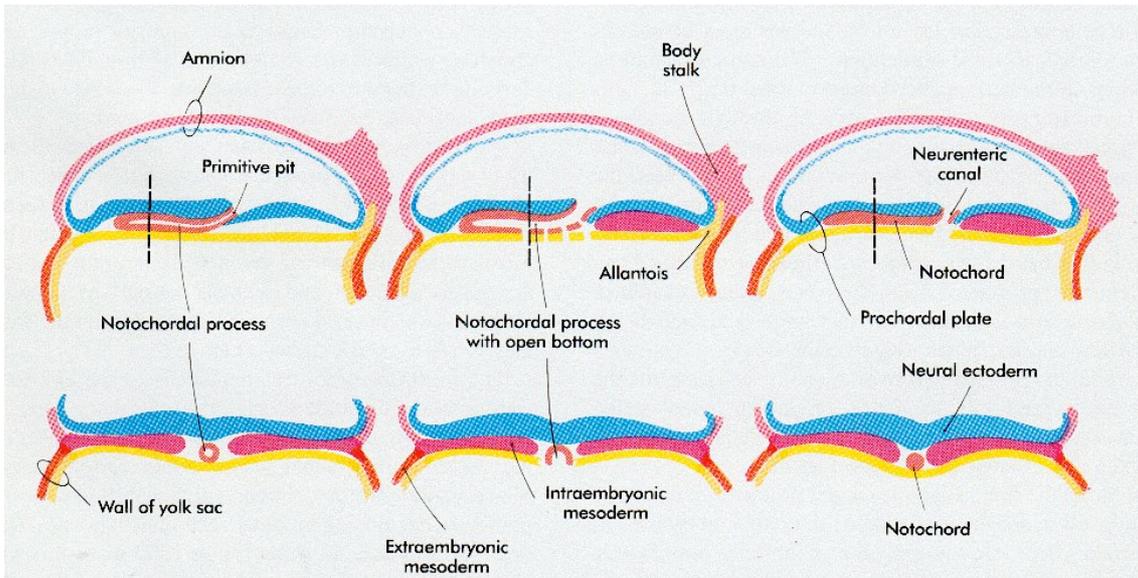


Fig. VI.3 – Etapes de la formation de la chorde et début de l'induction de la neurulation.

## La gastrulation et l'induction du mésoderme chez les Amphibiens

Modèle de l'œuf du Xénope (*Xenopus laevis*)

### **I. Introduction**

La *détermination* correspond à un processus qui engage les cellules dans une voie de différenciation donnée. Leur destinée est alors “fixée” et ces cellules sont dites “déterminées”. Deux mécanismes complémentaires interviennent dans la détermination. Le premier implique l'héritage cytoplasmique des cellules durant la segmentation. Le cytoplasme ovulaire, hétérogène, s'est réparti inégalement entre les blastomères dont les noyaux se trouvent au contact d'un cytoplasme de plus en plus diversifié et spécialisé. Il y a donc une ségrégation de *déterminants cytoplasmiques* entraînant la régionalisation des types cellulaires de la blastula en “territoires”. Le second mécanisme est constitué par un jeu de *communications chimiques* entre les cellules des différents territoires. Certaines cellules émettent un signal que d'autres cellules sont capables de recevoir et d'interpréter. L'interprétation du message permet alors l'expression sélective de certains gènes et la différenciation cellulaire selon un mode particulier. L'*induction* est le nom de ce procédé par lequel une cellule donnée instruit une cellule réceptrice en vue d'adopter une voie de différenciation précise. Cette cellule réceptrice est dite *compétente*; la cellule compétente qui a réagi à l'induction est alors *déterminée*.

Ce mécanisme de l'induction embryonnaire présente une grande ressemblance, une analogie réelle avec la communication cellulaire médiée par les **hormones**. Ce terme avait été proposé par Sir W.B. Hardy, puis officiellement reconnu par Sir E. Starling en 1905, devant le Royal College of Physicians de Londres. Le terme d' “hormones” vient du grec *hormân*, susciter, stimuler, exciter. Comme nous le verrons plus loin, la distinction entre les différentes formes de communication cellulaire (endocrine, paracrine, cryptocrine et autocrine) est fondamentale pour bien comprendre les mécanismes de l'induction embryonnaire.

L'observateur a depuis longtemps reconnu l'extrême diversité des programmes mis en jeu par les espèces animales pour transformer l'œuf en un organisme complexe, peuplé de milliers de types cellulaires différents. En dépit de cette diversité, la caractérisation des molécules qui contrôlent ces programmes a montré une conservation frappante des grands mécanismes de base. Par exemple, le développement de l'œil chez

*Drosophila melanogaster*, l'induction de la vulve chez *Caenorhabditis elegans* et l'induction de mésoderme par le fibroblast growth factor (FGF) chez le *Xenopus laevis* impliquent tous une activation de protéines capables de phosphoryler les résidus tyrosine (tyrosine kinases), au sein d'une même voie intracellulaire Ras-dépendante. De la même manière, une autre famille de kinases (sérine-thréonine kinases) joue un rôle critique dans l'induction mésodermique chez d'autres Vertébrés, la formation de la larve chez *C. elegans*, et la mise en place de l'axe dorsoventral chez la Drosophile.

## **II. Développement et segmentation précoce de l'œuf d'Amphibien (Fig. VI.4)**

Le pôle animal de l'ovocyte est pigmenté par de la mélanine, à l'inverse du pôle végétatif. Pendant sa croissance, des ARN messagers (ARNm) s'accumulent et forment un réservoir maternel pouvant soutenir les 12 premières divisions mitotiques. Des molécules d'information s'accumulent également soit par transcription et traduction secondaire, soit par l'intermédiaire de mécanismes de stockage encore inconnus.

Septante minutes après la fécondation, un déplacement de la couche pigmentaire superficielle s'effectue suivant un mouvement de bascule d'environ 30°, autour d'un axe passant par le centre de l'œuf. C'est la *rotation de symétrisation*. Le sens du déplacement est tel que le pigment descend vers le pôle végétatif du côté correspondant au point de pénétration du spermatozoïde et remonte vers le pôle animal du côté opposé. La zone de remontée est le croissant gris (en raison du pigment resté sur place) et il constitue la région dorsale de l'embryon. Cette rotation corticale est essentielle pour l'établissement du futur axe dorsoventral et l'utilisation d'agents inhibiteurs de ce processus (comme l'irradiation UV ou les inhibiteurs des microtubules) mène à des embryons dépourvus de structures axiales dorsales.

Une série de divisions rapides et synchrones (20 minutes par cycle) mène à la constitution de la blastula, munie de son blastocèle. A la différence des embryons de Mammifères, la transcription de gènes embryonnaires est absente pendant les 12 divisions de la segmentation. La transcription de nouveaux ARNm s'amplifie après, au moment de la *transition blastuléenne* (MBT) tandis que les divisions cellulaires ralentissent et deviennent asynchrones. L'induction du mésoderme se déroule probablement à ce stade, car les explants de cellules prélevées, même au stade de 64 cellules, à partir la zone équatoriale ou marginale, formeront en culture des dérivés du mésoderme.

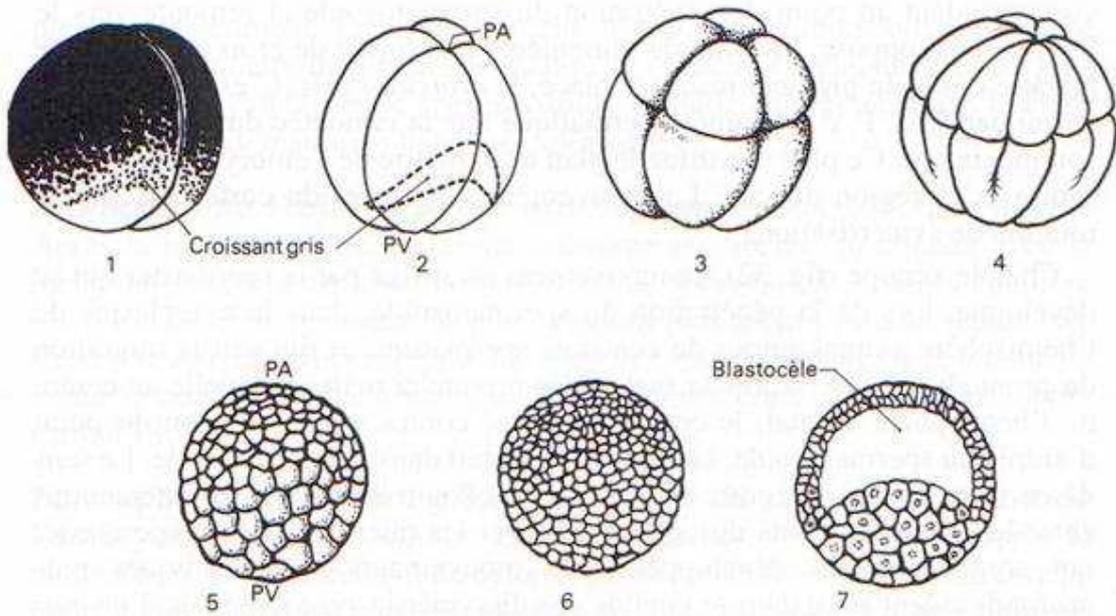
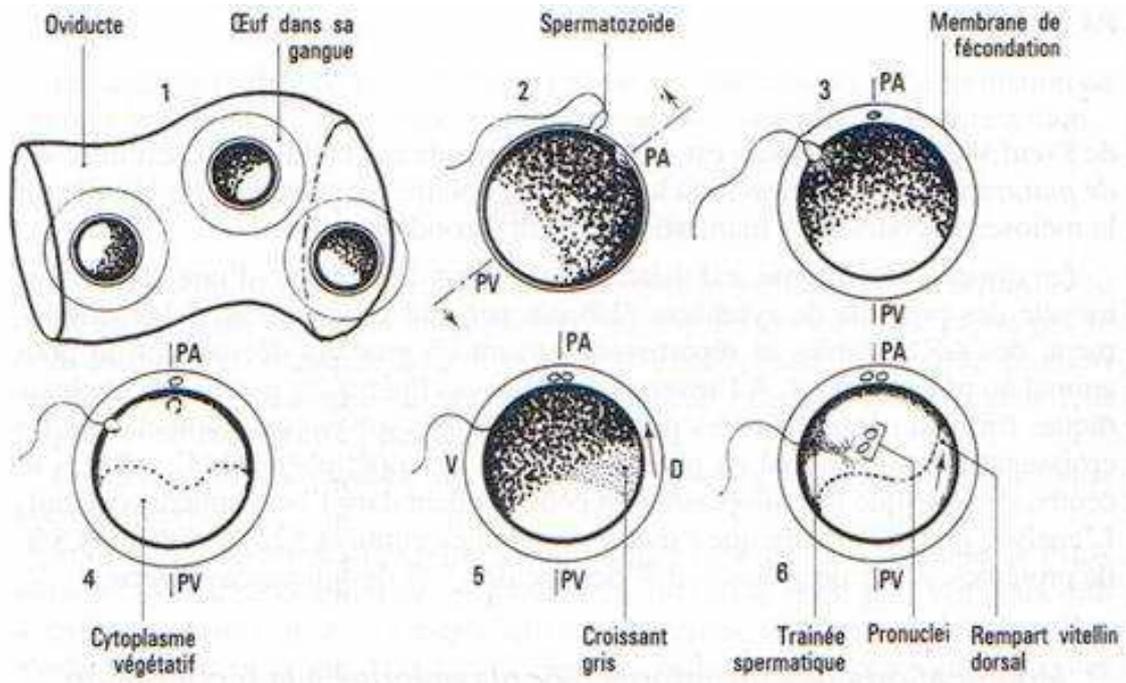


Fig. VI.4 - A. Rotations d'orientation et de symétrisation dans l'œuf d'Amphibien.  
 B. Rappel de la segmentation de l'œuf d'Amphibien.

Plusieurs heures après la transition blastuléenne, l'embryon est déjà segmenté en trois régions distinctes qui formeront les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Les cellules du pôle animal formeront l'ectoderme (peau et système nerveux), une sous-population de cellules de la région équatoriale donneront le mésoderme (sang, mésenchyme, muscle et notochorde), tandis que l'endoderme naîtra du pôle végétatif (tube digestif et annexes, foie, ...). La gastrulation commence par l'apparition d'un sillon transversal arqué vers le bas, situé en dessous de la zone qu'occupait le croissant gris de l'œuf fécondé. Ce sillon marque le *blastopore*, matérialise le plan de symétrie bilatérale et traduit le début de l'invagination du matériel entoblastique présomptif au niveau de sa lèvre dorsale. Les mouvements morphogènes de la gastrulation comprennent principalement:

- Invagination des cellules entoblastiques présomptives.
- Involution et enroulement du chordomésoblaste présomptif, assisté par un réseau de laminine et de fibronectine élaboré par les cellules ectoblastiques du toit du blastocèle.
- Epibolie des territoires ectoblastiques présomptifs.

Ces trois mouvements cellulaires aboutissent à la formation de l'*archentéron* (Fig. VI.5)

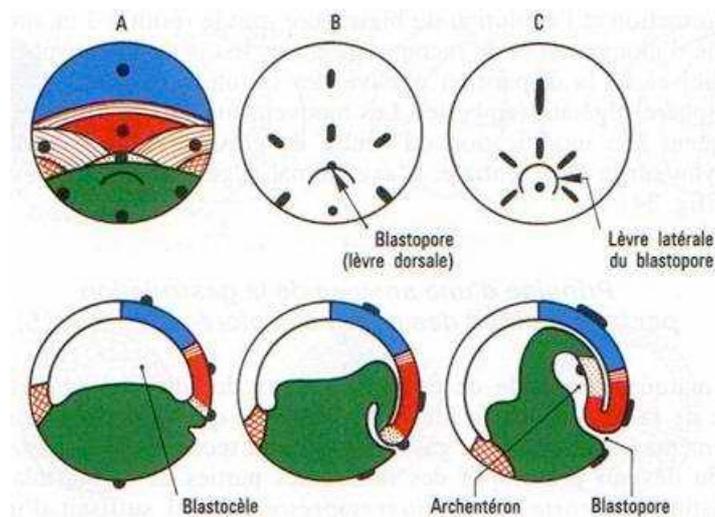


Fig. VI.5 - Gastrulation d'embryon d'Amphibien.

### III. Induction du mésoderme

Pour introduire ce problème fondamental, je rappellerai d'abord une expérience très connue, la greffe du "centre organisateur" réalisée par Spemann et Mangold en 1924 (qui a valu le premier prix Nobel en embryologie). Celle-ci fut obtenue par la transplantation de la lèvre dorsale du blastopore sur la face ventrale d'une autre gastrula de triton. Le développement aboutit à la formation d'un embryon double (Fig. VI.6). De nos jours, l'induction d'un second centre organisateur peut être obtenue par l'injection d'ARNm de Xwnt (voir plus loin).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

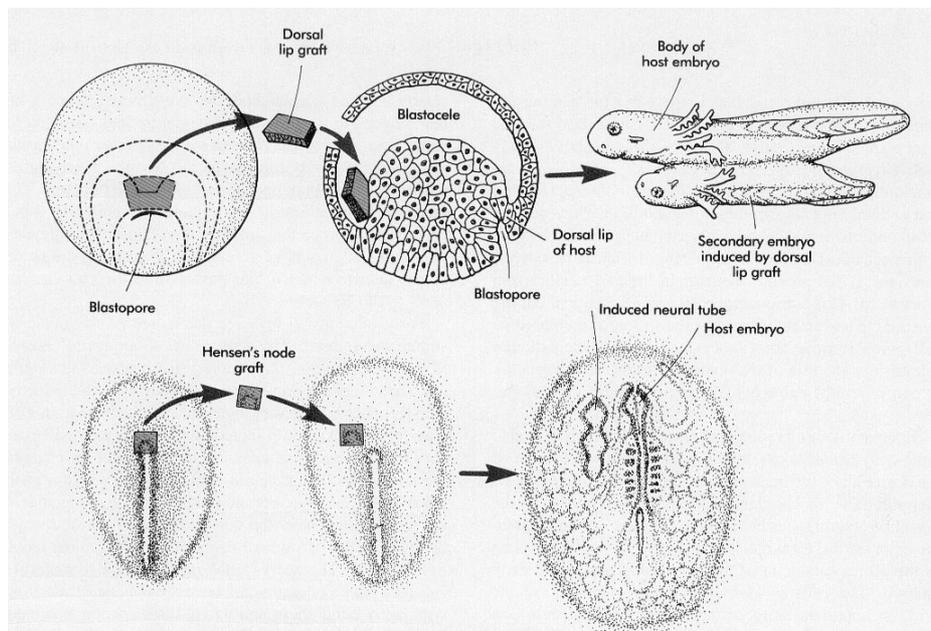


Fig. VI.6 - *Expérience de Spemann et Mangold (1924)*

Dans la blastula du Xénope, le mésoderme est à la frontière de l'hémisphère animal et du végétatif, la zone marginale de la blastula. Au stade de 32 cellules, l'embryon est composé de quatre assises (A, B, C et D) de huit blastomères, étagées selon l'axe pôle animal-pôle végétatif. Si l'on explante la rangée A, celle-ci se différencie en épiderme. En combinaison avec le blastomère végétatif dorsal D1, on observe la différenciation de mésoderme dorsal dans l'explant (chorde et muscle). Avec le blastomère végétatif ventral D4, le mésoderme sera alors de type ventral (mésenchyme, mésothélium, cellules sanguines). Les cellules mésodermiques observées dérivent des blastomères de la rangée A. Les blastomères D1 et D4 isolés ne forment que de l'endoderme. Ce type d'expérience suggère que deux types de signaux inducteurs sont émis par l'hémisphère végétatif, un signal dorsal et un signal ventral. Nieuwkoop a démontré en 1969 l'existence de ces phénomènes dans l'embryon de Salamandre, tandis que Dale et Slack rapportaient en 1987 des conclusions semblables chez l'embryon de Xénope au stade de 32 cellules (Fig. IV.7). Les blastomères végétatifs dorsaux qui induisent le mésoderme dorsal, lui-même à l'origine de l'organisateur de Spemann, portent le nom de centre de Nieuwkoop.

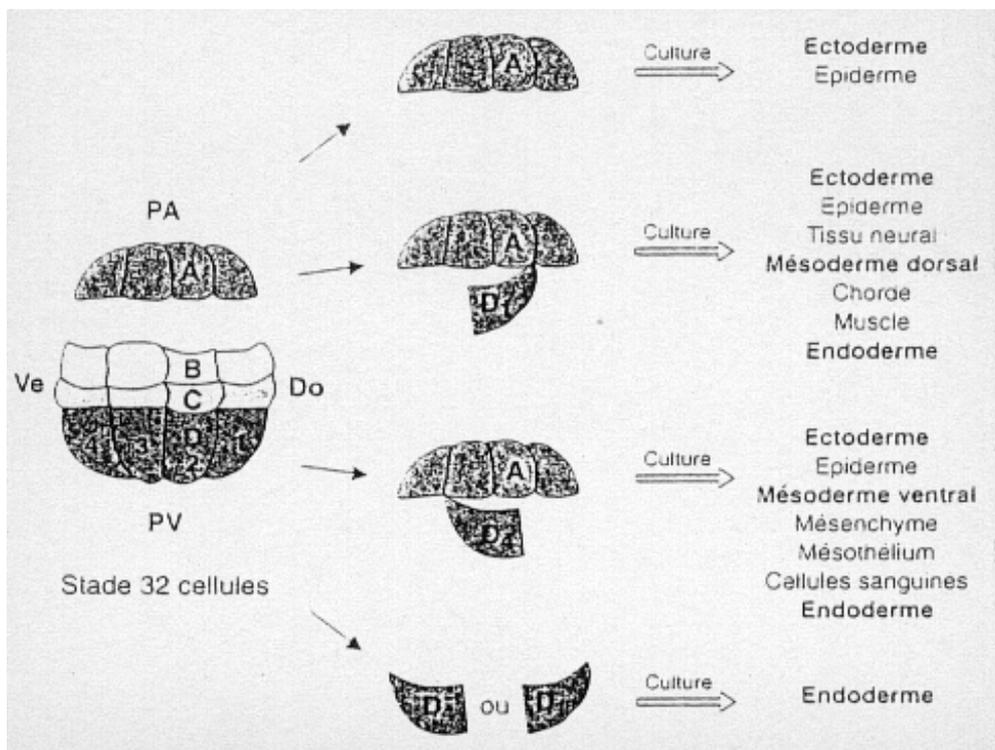


Fig. VI.7 - Mise en évidence chez le Xénope des signaux inducteurs du mésoderme par la recombinaison de blastomères au stade de 32 cellules.

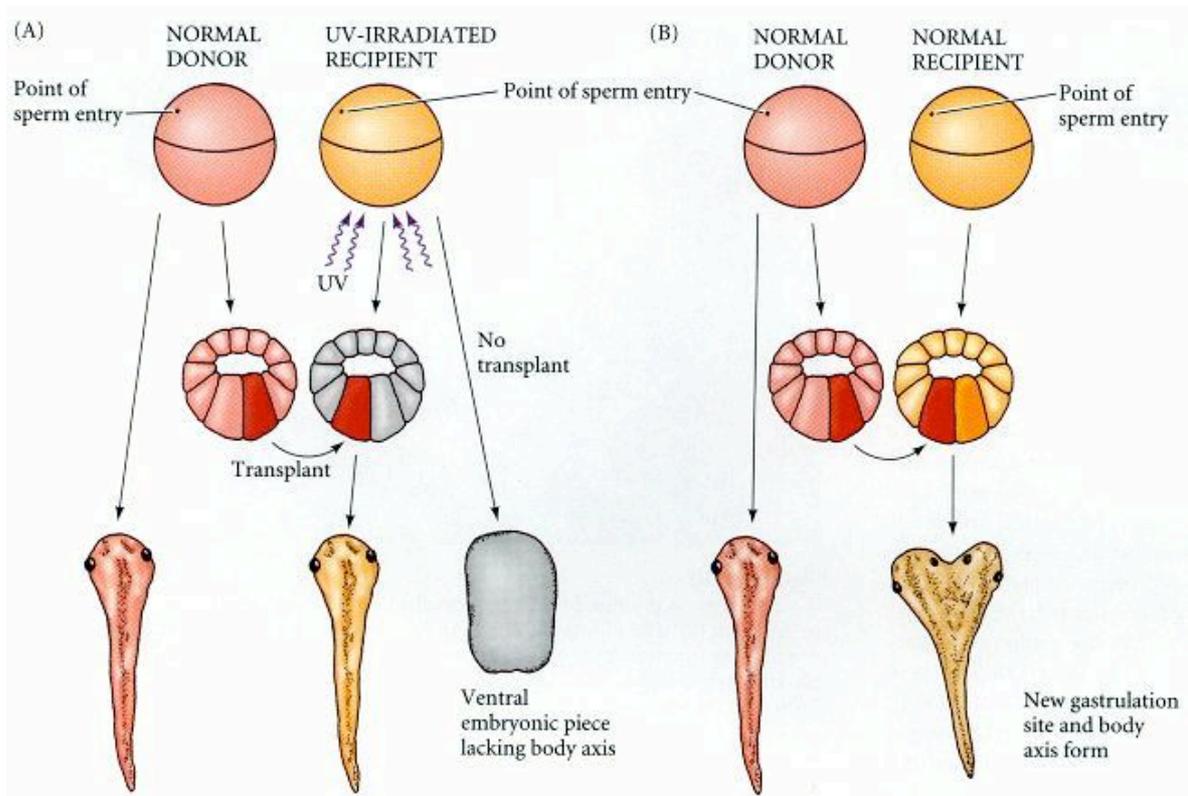


Fig. VI.8 – *Expérience et mise en évidence du centre de Nieuwkoop: mise en évidence par la greffe de blastomère au stade 32 cellules chez le Xénope.*

*Un blastomère végétatif dorsal d'un embryon non irradié est greffé à la place d'un blastomère végétatif d'un embryon irradié par UV au stade indivis. Cette irradiation inhibe l'établissement de la polarité dorsoventrale et l'absence secondaire de l'axe embryonnaire. La transplantation du blastomère végétatif dorsal rétablit la polarité dorsoventrale. Au stade 32 cellules, les blastomères végétatifs dorsaux induisent la formation d'un axe embryonnaire sans y participer. Les cellules dérivant de ces blastomères végétatifs dorsaux constituent le centre de Nieuwkoop qui est défini comme le lieu d'émission des signaux inducteurs de l'organisateur de Spemann.*

En culture, la zone marginale ventrale donne du mésenchyme ventral (mésenchyme, mésothélium, sang). Lorsqu'elle est recombinaée avec la zone marginale dorsale, la zone ventrale donne naissance à d'importantes quantités de muscle. Ceci peut s'expliquer par l'émission d'un signal provenant de la zone marginale dorsale qui "dorsalise" le mésoderme ventral adjacent (Fig. VI.9).

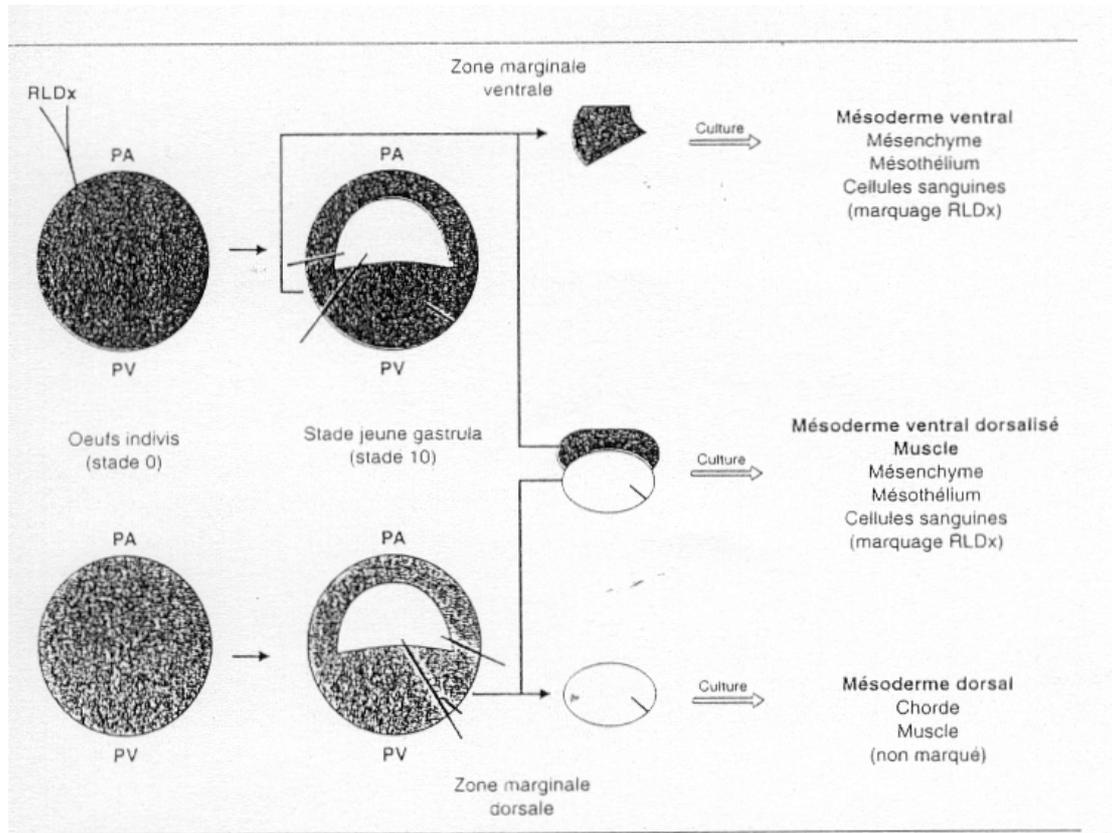


Fig. VI.9 - Expérience illustrant l'effet dorsalisant de l'organisateur de Spemann.

Les données fournies par l'embryologie expérimentale ont permis d'établir la chronologie des processus aboutissant à la mise en place du mésoderme chez le Xénope. Elles sont rassemblées dans le *modèle des trois signaux* (Fig. IV.10). Au moment de la fécondation, la rotation corticale active des déterminants dorsaux dans la future région dorsale de l'embryon. Avant la transition blastulénne, des signaux émis par l'hémisphère végétatif induisent les cellules de la zone équatoriale à former du mésoderme. Dans la région dorsale, les blastomères végétatifs dorsaux du centre de Nieuwkoop émettent un premier signal (DV) qui induit le mésoderme dorsal qui constituera le centre organisateur de Spemann (O). Les blastomères végétatifs latéraux et ventraux émettent un second signal (VV) qui induit les régions latérale et ventrale de

la zone équatoriale en mésoderme ventral (MV). La régionalisation du mésoderme est définitivement établie au cours de la gastrulation par l'action d'un troisième signal qui "dorsalise" le mésoderme ventral adjacent assure sa répartition au sein des zones M1, M2 et M3.

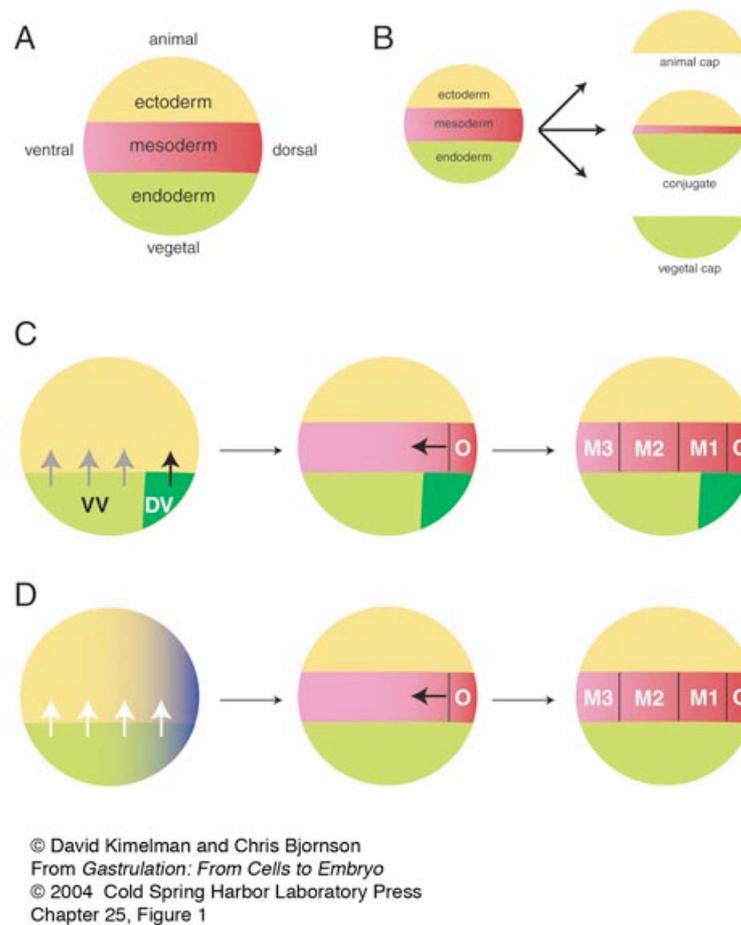


Fig. VI.10 - Modèle des trois signaux pour l'induction du mésoderme chez l'embryon de Xénope (Slack et coll., 1987).

#### ***IV. Les molécules inductrices du mésoderme***

Au cours des dernières années, une série d'hormones ont été identifiées en tant que facteurs de croissance capables d'induire du mésoderme *in vitro* à partir de la calotte animale ectodermique de la blastula de Xénope. Ces facteurs de croissance appartiennent aux familles des facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) et des facteurs de croissance transformants (TGF $\beta$ ).

Les membres de la famille FGF induisent la différenciation de tissu musculaire, de mésenchyme et de mésothélium. Ceux de la famille TGF $\beta$  induisent du mésoderme dorsal, en particulier la chorde (Fig. VI.11). La question se pose actuellement de savoir quels sont les facteurs actifs sur la différenciation *in vivo* ? On sait que tous les membres de la famille FGF (à l'exception de FGF-7 ou KGF) induisent du mésoderme *in vitro*. Les ARNm et/ou les protéines de quatre membres de la famille FGF ont été mis en évidence chez l'embryon de Xénope. Trois d'entre eux, le FGF basique (FGFb), le FGF acide (FGFa) et le *Xenopus* FGF (XeFGF) sont hérités directement de la mère (empreinte parentale). Ces protéines peuvent jouer le rôle de signal et des récepteurs aux FGF ont été isolés à partir d'embryons de Xénope. Par manipulation génétique, on a pu rendre inactifs les récepteurs aux FGF et une inhibition du développement des structures troncales et caudales a été observée. Ceci confirme le rôle essentiel des FGF dans l'induction du mésoderme.

Une protéine Vg1 de la famille du TGF $\beta$  est abondante au niveau de l'hémisphère végétatif de l'œuf et la blastula, mais son rôle n'est pas encore certain dans la formation du mésoderme. Deux autres membres de la famille TGF $\beta$ , les *activines* (activine A et activine B) peuvent être détectées dans des milieux de culture conditionnés par les cellules d'une lignée établie à partir du Xénope. Les activines sont de puissants inducteurs de mésoderme *in vitro*. Il existe toutefois une discordance entre l'expression tardive des transcrits codant pour les activines et leur rôle attribué dans la formation précoce du mésoderme. Une hypothèse serait que les cellules folliculaires ovariennes sécrètent en abondance de l'activine B qui serait alors captée et accumulée par les ovocytes à la fin de l'ovogenèse. Des récepteurs à l'activine ont été identifiés et clonés chez le Xénope. Ces récepteurs sont des sérine-thréonine kinases et leur inactivation empêche l'induction normale du mésoderme chez l'embryon *in vivo*.

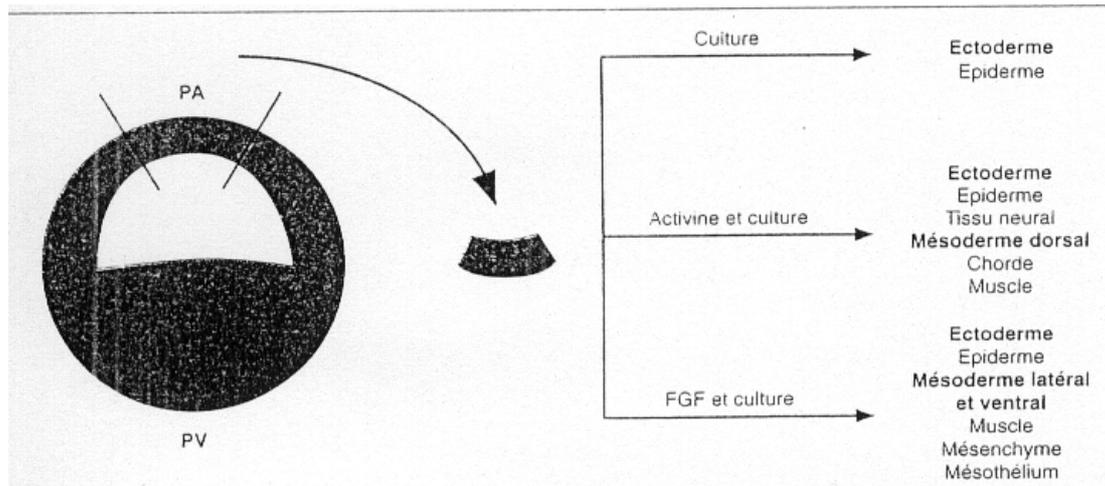


Fig. VI.11 - Induction de mésoderme dans la calotte animale ectodermique par les facteurs de croissance de la famille FGF ou TGF $\beta$ .

Récemment ont été découvertes des molécules qui, lorsqu'elles sont exprimées dans l'œuf de Xénope traité aux UV, induisent un axe embryonnaire complet. Il s'agit des produits des gènes de la famille *Wnt* et du gène *noggin*. Les gènes *Wnt* comprennent le proto-oncogène murin *wnt-1* dont l'homologue chez la Drosophile est le gène *wingless*. Ces gènes codent pour des protéines sécrétées qui sont associées à la surface des cellules et à la matrice extracellulaire. L'intérêt porté aux gènes *Wnt* résulte de l'observation que l'injection, dans la partie ventrale de l'œuf, d'ARNm codant pour *Wnt-1* ou pour *Xwnt-8*, entraîne la formation d'un second axe embryonnaire. Cette observation rejoint donc, au niveau moléculaire, celle établie par l'expérience classique de Spemann. Il semble aussi acquis que les protéines encodées par les gènes *Wnt* agissent en synergie avec l'activine et/ou le FGFb pour l'induction du mésoderme, éventuellement pour en modifier le caractère (ventral ou dorsal). C'est pourquoi on a appelé ces facteurs *Wnt* des "modificateurs de compétence".

*Noggin* peut restaurer comme *Xwnt-8* un axe embryonnaire dans l'œuf irradié aux UV. Cet axe est complet et pourvu des structures céphaliques les plus antérieures. *Noggin* est d'expression maternelle, ce qui est en accord avec sa fonction de centre de Nieuwkoop. Il apparaît ainsi de plus en plus que l'activité de ce centre résulterait d'une combinatoire où interviendraient des facteurs de croissance inducteurs, tels l'activine et le FGF, ainsi que des facteurs de signalisation "modulateurs", tels *noggin* et des

membres de la famille *Wnt*. Plus tard, chez la gastrula, *noggin*, qui est alors exprimé dans l'organisateur de Spemann, joue le rôle d'un facteur "dorsalisant" intervenant dans la régionalisation dorsoventrale du mésoderme.

Les recherches actuelles visent à identifier les gènes codant pour des facteurs de transcription dont l'expression va être régulée au cours de la gastrulation par les agents inducteurs et modificateurs signalés ci-dessus. Certains ont d'ores et déjà été caractérisés comme *goosecoid*, *Xlim-1*, *Xnot*, *Pintallavis*, ou *XFKH-1*. Ce sont tous des gènes homéotiques (ou à homéoboîte) dont la fonction sera abordée dans un autre chapitre. Le *goosecoid* joue un rôle essentiel dans l'acquisition des propriétés de l'organisateur de Spemann.

La Figure VI.12 reprend l'essentiel des données exposées ci-dessus et essaie de donner une interprétation cohérente des diverses interactions moléculaires qui interviennent dans ce phénomène crucial qu'est l'induction du mésoderme chez les Vertébrés.

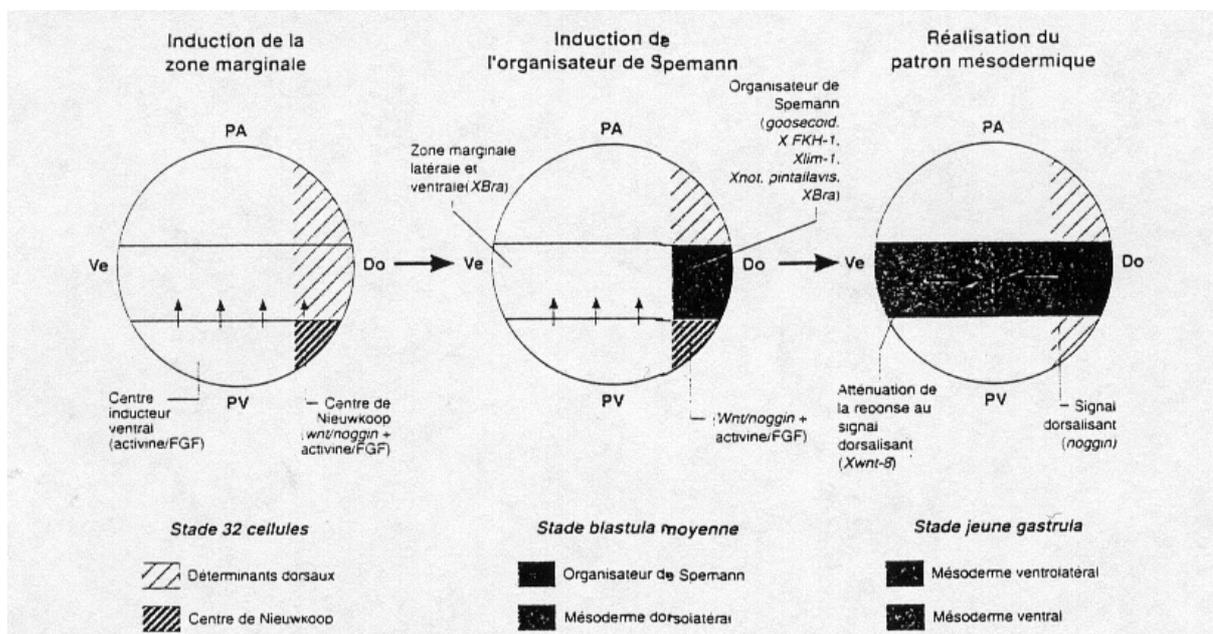


Fig. VI.12 - Modèle d'interprétation moléculaire de l'induction du mésoderme.

## ***VII. Placenta et membranes extra-embryonnaires***

Une fois l'implantation terminée et l'invasion en cours, l'apport énergétique au fœtus, sa nutrition et sa tolérance sont assurées durant la vie intra-utérine par le placenta et par les membranes extra-embryonnaires qui se trouvent à l'interface entre l'embryon et la mère.

### **1. Les membranes extra-embryonnaires** (Fig. VII.1)

#### *L'AMNION*

La *cavité amniotique* se développe au début à l'intérieur de la masse cellulaire interne pendant la phase d'implantation de l'embryon. Par après, elle suit intimement la phase de repliement de l'embryon et protège le fœtus d'adhésions avec l'environnement trophoblastique.

La *membrane amniotique* consiste en un simple couche de cellules ectodermales extra-embryonnaires, disposée le long d'une couche de mésoderme extra-embryonnaire.

Le *fluide amniotique* est un transsudat dilué du plasma maternel, mais son origine et les échanges dynamiques intervenant dans sa formation ne sont pas connus avec précision. Dans la deuxième partie de la grossesse, après la 20ème semaine, on assiste à un accroissement des contributions de l'urine fœtale, de la filtration du sang maternel dans le chorion (étroitement apposé à la membrane amniotique à ce moment-là), et peut-être de la filtration du sang fœtal à partir des vaisseaux ombilicaux et de la plaque choriale. A la fin de la grossesse, le volume des échanges peut atteindre 500 ml par heure (dont 20 ml sont absorbés par le fœtus). La quantité totale de liquide amniotique à terme est entre 500 et 1000 ml. Une quantité supérieure se voit dans l'*hydramnios* (qui accompagne les grossesses multiples et l'anencéphalie). La situation inverse ou *oligohydramnios* est souvent associée avec une agénésie rénale bilatérale (absence de reins).

L'*amniocentèse* ou ponction de liquide amniotique ne se pratique pas en général avant la 13ème ou la 14ème semaine de grossesse, car la quantité est trop faible chez l'embryon précoce. Le liquide amniotique possède des propriétés bactériostatiques qui

peuvent partiellement expliquer le faible pourcentage d'infections après amniocentèse. Les cellules fœtales présentes dans le liquide de ponction peuvent être mises en culture ou observées directement pour un typage chromosomique et/ou la détection d'un trouble métabolique. Une concentration élevée d'*α-fœtoprotéine* dans le liquide amniotique, par exemple, est un bon indicateur d'un déficit du tube neural. La maturité fœtale peut aussi être appréciée le taux de *créatinine* ou par le rapport *lécithine/sphingomyéline* (reflet direct de la maturité de l'arbre bronchique et de l'appareil respiratoire). L'érythroblastose fœtale (maladie Rhésus, voir plus loin) peut également être évaluée par l'examen du liquide amniotique.

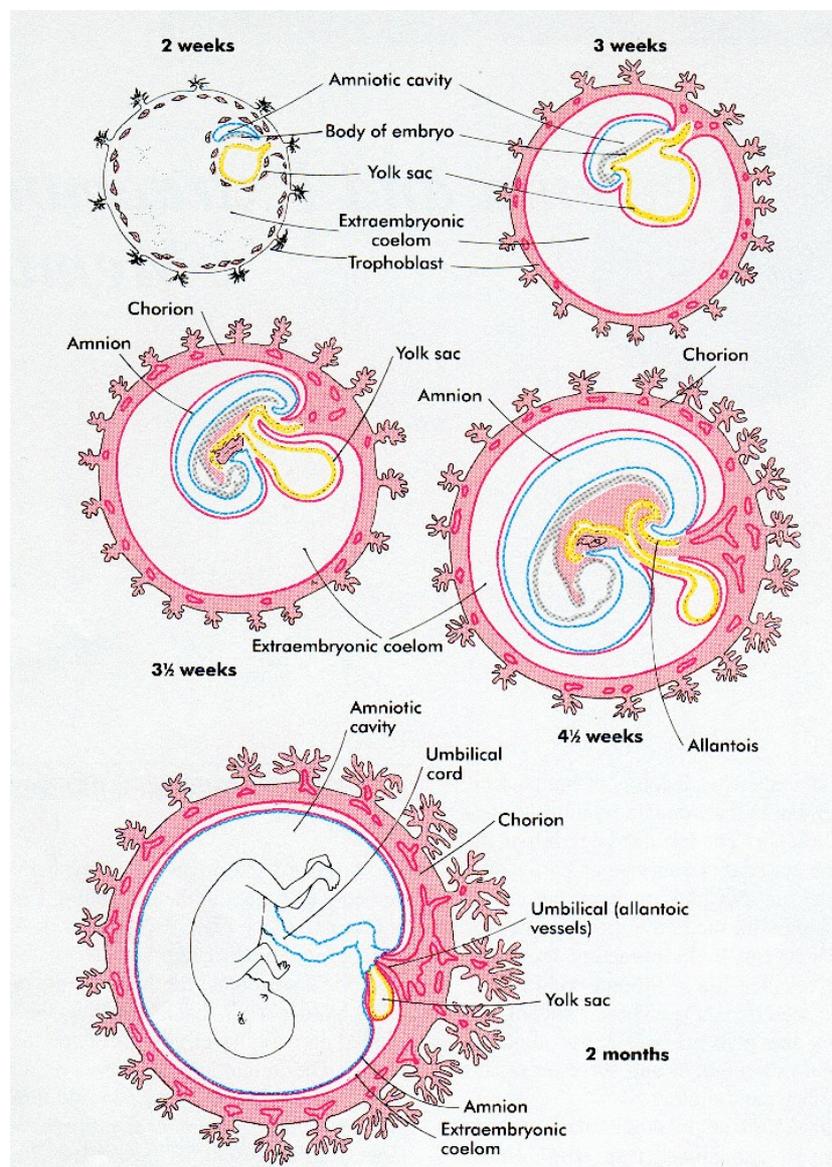


Fig. VII.1 - Relations entre le chorion et les autres membranes extra-embryonnaires.

### *LE SAC VITELLIN (LECITHOCELE)*

Celui-ci apparaît du côté ventral de l'embryon lorsque ce dernier est encore au stade de disque à deux feuilletts. Il est délimité par l'endoderme extra-embryonnaire provenant de l'hypoblaste. Par contraste avec les Oiseaux et les Reptiles, le sac vitellin des Mammifères est très petit et dépourvu de vitellus. Malgré son côté vestigial en termes d'organe nutritif, le sac vitellin reste un élément vital pour l'embryon à cause d'une série d'autres fonctions.

L'endoderme du sac vitellin est entouré à l'extérieur par du mésoderme extra-embryonnaire bien vascularisé. Comme nous l'avons vu plus haut, ce mésoderme provient en majeure partie de la délamination et de la différenciation de certaines cellules de l'hypoblaste/endoderme extra-embryonnaire. Au cours de la 3ème semaine, les *cellules germinales primordiales* deviennent identifiables au niveau de la paroi postérieure de l'endoderme bordant le sac vitellin (voir Fig. III.1). Ces cellules migrent vers la zone gonadique à travers le mésentère dorsal, dans la paroi postérieure de la cavité abdominale primitive.

Dans le même temps, des groupes de cellules mésodermiques de la paroi du sac vitellin s'organisent en îlots sanguins, et un certain nombre d'entre elles se différencient en cellules sanguines primitives. Une *hématopoïèse extra-embryonnaire* prend place dans la paroi du sac vitellin jusqu'à la 6ème semaine, lorsque cette activité est alors transférée vers le foie fœtal.

Le sac vitellin s'allonge progressivement et s'incorpore peu à peu dans le corps du cordon ombilical. Du côté embryonnaire, le contact avec le tube digestif primitif disparaît aussi peu à peu et est définitif à la 6ème semaine. Chez certains adultes, un reste de sac vitellin peut persister sous la forme d'une corde fibreuse ou un diverticule de la paroi de l'intestin grêle (*diverticule de Meckel*). Si le sac vitellin a une fonction importante pendant la période embryonnaire, celle-ci devient insignifiante au cours de la vie fœtale.

### *L'ALLANTOÏDE*

Il s'agit d'une excroissance d'endoderme à la paroi ventrale du tube digestif, qui ne représente chez l'embryon humain qu'un vestige de la structure utilisée par les Oiseaux, les Reptiles et de nombreux Mammifères en tant qu'un organe respiratoire important et de réceptacle pour les déchets urinaires.

A la naissance, l'allantoïde n'est plus qu'une mince corde fibreuse (ligament ombilical médian) tendue entre la vessie et la région ombilicale.

## **2. Le placenta et le chorion**

L'implantation nécessite un synchronisme étroit entre l'acquisition des capacités 'invasives' des cellules trophoblastiques et l'état 'réceptif' de l'endomètre utérin. Après l'implantation, le trophoblaste d'origine entourant l'embryon se différencie en deux types de feuillet, le *cytotrophoblaste* interne et le *syncytiotrophoblaste* externe. Des lacunes remplies de sang maternel apparaissent dans le trophoblaste invasif, et les cellules conjonctives de l'endomètre utérin ont subi la *décidualisation* en réponse à l'invasion trophoblastique. Pour rappel, cette décidualisation implique que les cellules de l'endomètre et du stroma utérin avoisinant deviennent des cellules de type sécrétoire, capables de synthétiser du glycogène (réserve de glucose), des lipides et différents facteurs de croissance ou cytokines. La pénétration du syncytiotrophoblaste dans la decidua (rupture de la membrane basale épithéliale, invasion du tissu conjonctif, rupture de la basale endothéliale et disparition de l'endothélium vasculaire) est corrélée avec la production d'enzymes protéolytiques (activateur du plasminogène et métalloprotéases) par le syncytiotrophoblaste. Cependant les cellules déciduales, voire les cellules épithéliales utérines, pourraient être aussi impliquées dans la rupture de la basale.

### *FORMATION DES VILLOSITES CHORIALES (Fig. VII.2)*

Des excroissances de trophoblaste pénètrent à l'intérieur dans la paroi de l'utérus (villosités primaires), puis se remplissent de cellules mésenchymateuses provenant du mésoderme extra-embryonnaire (villosités secondaires). Lorsque des vaisseaux embryonnaires pénètrent ces villosités à la fin de la 3ème semaine, elles deviennent tertiaires.

L'extrémité d'une villosité demeure sous la forme d'une colonne cytotrophoblastique, entourée d'une mince couche de syncytiotrophoblaste. Puis les colonnes cytotrophoblastiques pénètrent à l'intérieur du syncytium et fusionnent entre elles pour former une *enveloppe complète* (ou *coque*) de cytotrophoblaste qui se trouve directement apposée aux cellules déciduales maternelles. Les villosités d'ancrage (*villosités crampons*) représentent les points d'attachement réels entre le complexe embryonnaire et les tissus maternels.

Outre l'amniocentèse mentionnée ci-dessus, le prélèvement des villosités choriales représente une deuxième source d'informations pour le diagnostic prénatal. La troisième source est la cordocentèse ou prélèvement de sang fœtal au niveau du cordon. Les villosités choriales peuvent être prélevées entre 10 et 11 semaines d'aménorrhée, et la

mise en culture des cellules trophoblastiques à index mitotique élevé est relativement aisée. La carte chromosomique de l'embryon peut donc être établie aisément à partir de cette source cellulaire. Des études métaboliques peuvent aussi être réalisées à partir de tels prélèvements (pour le diagnostic de certaines maladies de surcharge en glucides).

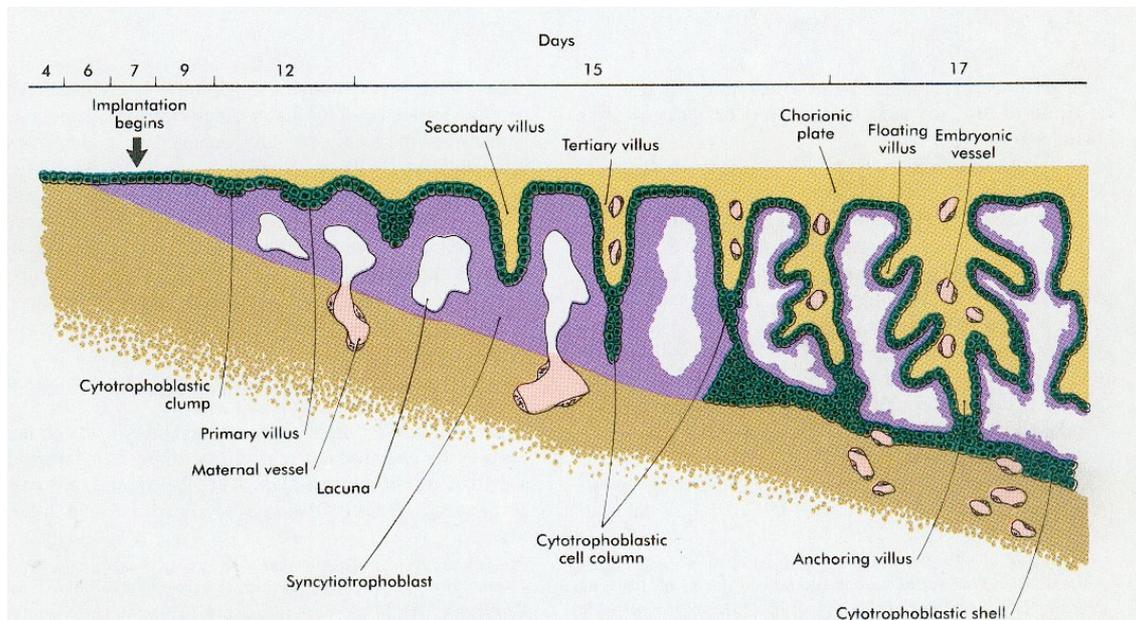


Fig. VII.2 - Etapes de la formation d'une villosité choriale depuis le bourgeonnement cytotrophoblastique (à gauche) jusqu'à la villosité crampon (à droite).

### Vue d'ensemble (Fig. VII.3)

L'embryon à ce stade est suspendu dans la *cavité chorionique*, attaché par le *pédicule embryonnaire*, qui deviendra plus tard le *cordon ombilical*. La cavité chorionique est délimitée par la plaque choriale formée du mésoderme extra-embryonnaire recouvert par le trophoblaste. Vers le début du 2ème mois, le trophoblaste (qui va prendre le nom de chorion) présente un grand nombre de villosités choriales qui lui donnent un aspect radié caractéristique. Ces villosités sont amarrées au mésenchyme de la plaque choriale et, du côté périphérique, s'attachent à la décidua maternelle par l'intermédiaire de la coque cytotrophoblastique. Leur revêtement superficiel est formé de syncytium qui repose sur une couche de cellules cytotrophoblastiques, lesquelles recouvrent à leur tour un axe mésenchymateux vasculaire. Le réseau capillaire de l'axe du tronc villositaire rencontre les capillaires de la face interne du chorion et du pédicule embryonnaire, donnant ainsi naissance au système vasculaire extra-embryonnaire.

Par bourgeonnement des troncs vilieux existants, des petites expansions apparaissent par après dans les *chambres intervilluses* ou *espaces lacunaires*. Bientôt, les circulations maternelles et fœtales ne sont plus séparées que par le syncytiotrophoblaste, le mésenchyme extra-embryonnaire et la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins fœtaux.

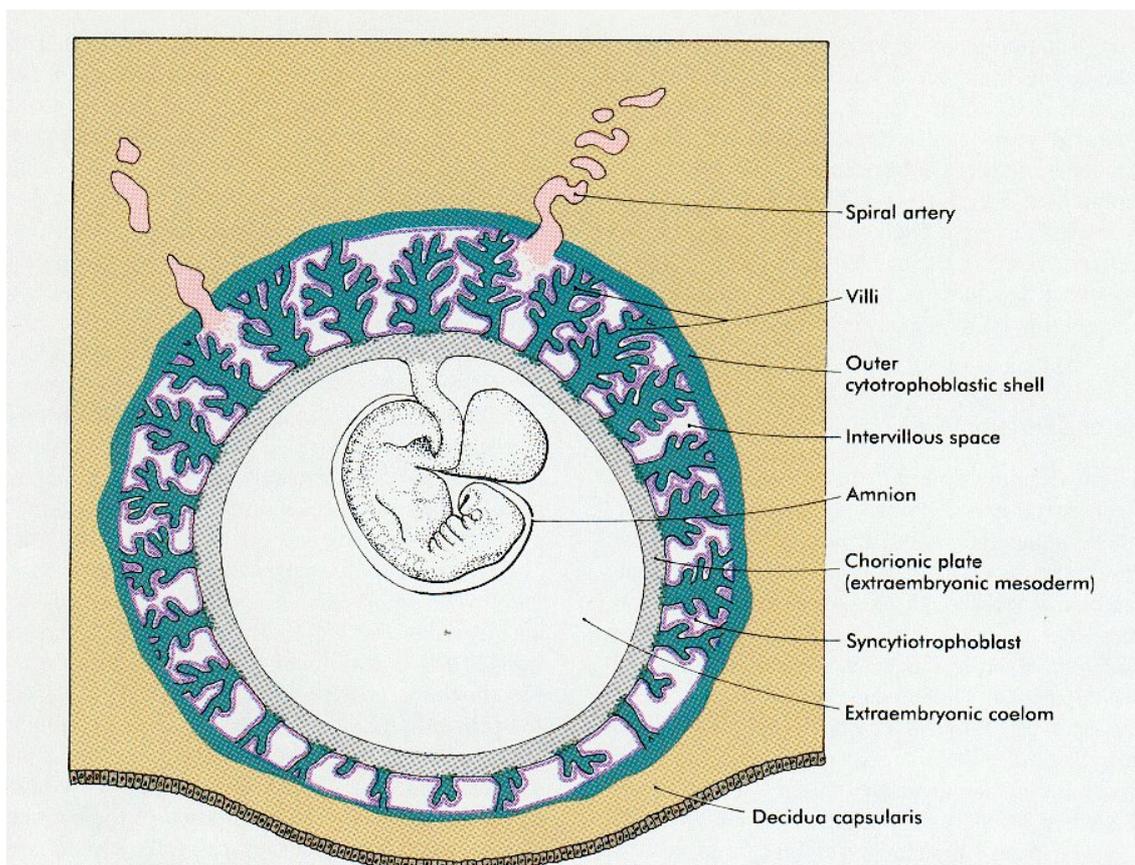


Fig. VII.3 - Vue d'ensemble d'un embryon de 5 semaines et des relations entre la plaque choriale, les villosités et l'enveloppe cytotrophoblastique.

#### CHORION VILLEUX ET PLAQUE DECIDUALE (Fig. VII.4)

Les villosités choriales continuent à proliférer dans la région du pôle embryonnaire, donnant naissance au *chorion frondosum* (chorion vilieux ou chevelu). Au pôle anti-embryonnaire, les villosités dégénèrent et cette partie du chorion apparaît lisse (*chorion laeve*).

Cette différence entre les pôles embryonnaire et anti-embryonnaire du chorion se retrouve dans la structure de la caduque déciduale, couche fonctionnelle de l'endomètre utérin qui tombera lors de l'accouchement. Face au chorion chevelu, c'est la *caduque*

*basilaire*, ou *plaque déciduale*, constituée d'une couche compacte en connexion étroite avec le chorion. Face au pôle anti-embryonnaire, c'est la *décidua capsulaire* qui se distend avec le développement de l'embryon, puis dégénère. Par la suite le chorion lisse va se trouver en contact avec la *décidua pariétale*, tapissant le côté opposé de l'utérus et il va fusionner avec elle. La lumière utérine est ainsi oblitérée. Ainsi la seule portion fonctionnelle du chorion est le chorion vilieux qui constitue le placenta avec la caduque basilaire. De la même façon, amnios et chorion fusionnent pour former la membrane amnio-chorionique qui oblitère la cavité chorionique. Cette membrane se rompt au cours du travail.

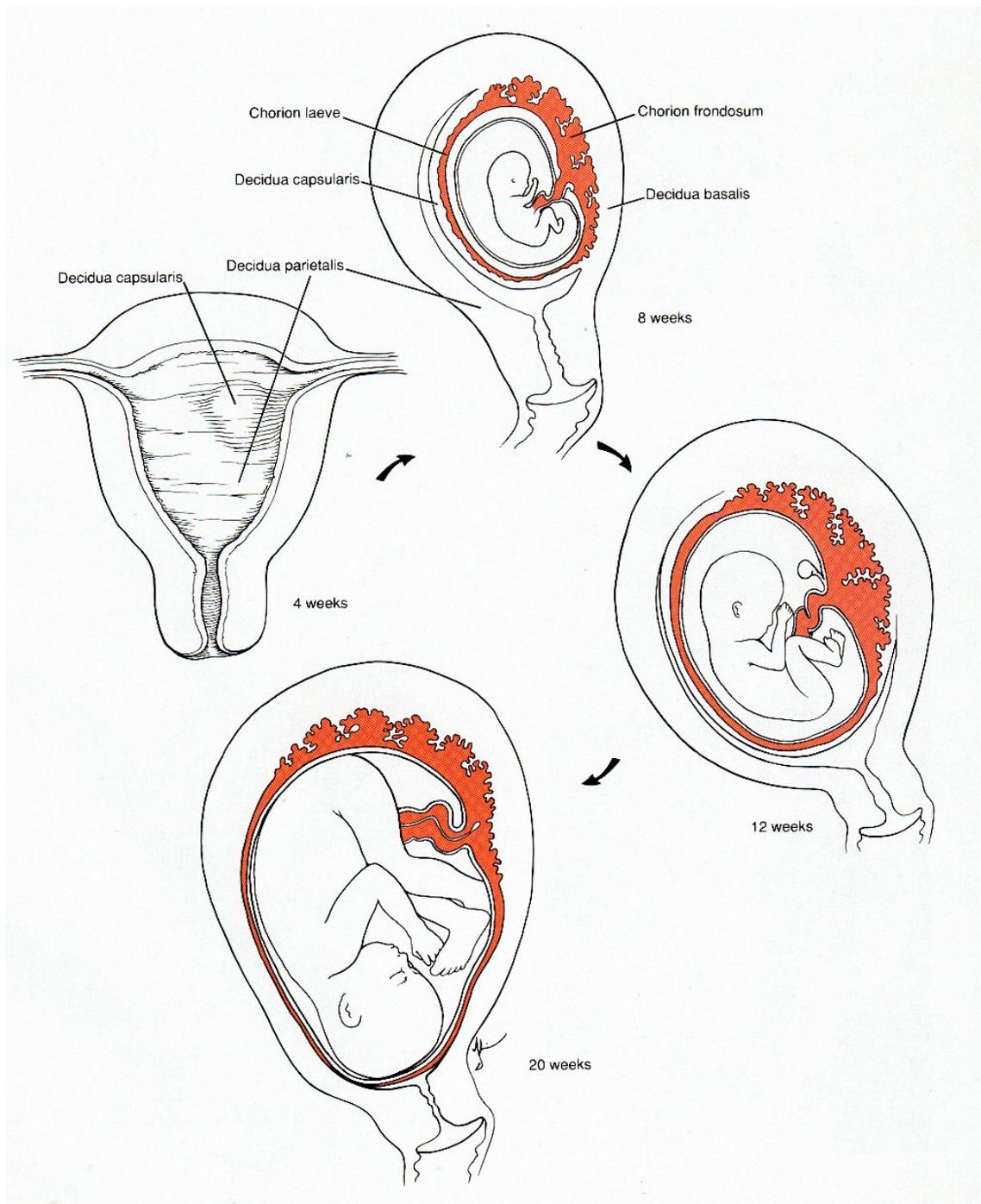


Fig. VII.4 – Relations entre paroi utérine et disposition du placenta.

## STRUCTURE DU PLACENTA

Le placenta est composé de deux éléments: 1° une portion fœtale formée par le chorion vilieux; 2° une portion maternelle formée par la caduque basilaire. La face fœtale est limitée par la plaque choriale; sa face maternelle est limitée par la plaque déciduale, intimement incorporée au placenta. Entre plaque choriale et plaque déciduale se trouvent les chambres intervillieuses qui sont remplies de sang maternel et tapissées de syncytium d'origine fœtale. Les troncs vilieux émettent leurs ramifications à l'intérieur de ces lacs sanguins intervillieux.

Au cours des 4ème et 5ème mois, la caduque basilaire émet les *septa intercotylédonaires* qui font saillie dans les lacs sanguins mais n'atteignent pas la plaque choriale. Ces septa ont un axe de tissu maternel, mais ils sont recouverts en surface par une couche de syncytiotrophoblaste, de telle sorte qu'à tout moment la circulation maternelle et les lacs sanguins fœtaux sont séparés par une couche de syncytium. Le placenta est ainsi divisé en un certain nombre de compartiments, les *cotylédons*. Les septa n'atteignent pas la plaque choriale et laissent en communication les chambres intervillieuses des différents cotylédons.

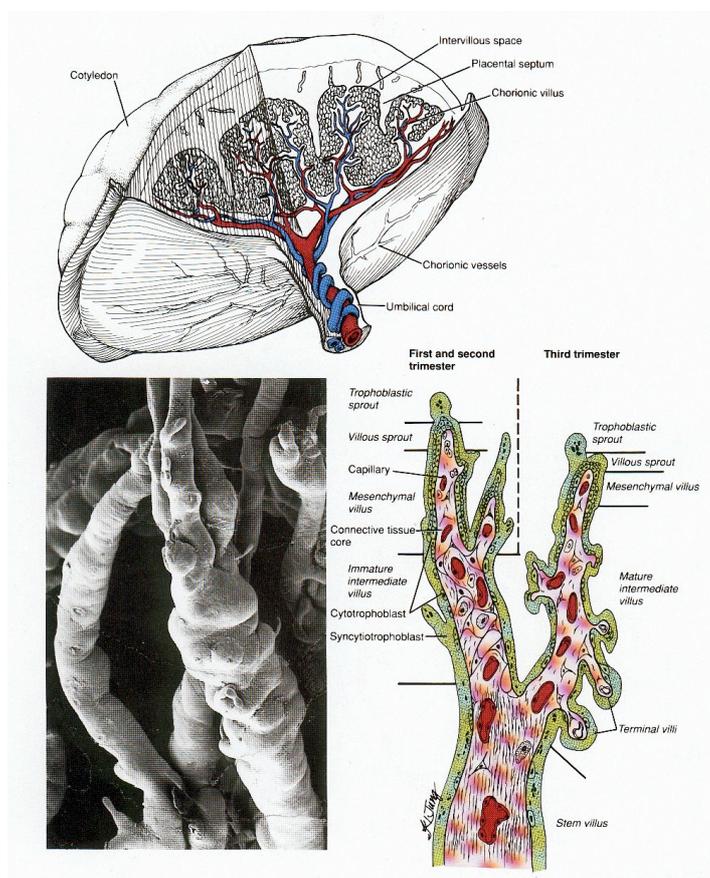


Fig. VII.5 – Structure du placenta et des villosités placentaires.

## *CIRCULATION PLACENTAIRE*

Les cotylédons reçoivent leur vascularisation de 80 à 100 artères spiralées qui traversent la plaque déciduale et pénètrent dans les espaces intervilloux à intervalles plus ou moins réguliers. Le sang est chassé dans les lacs sanguins où toutes les branches du tronc villositaire primaire se trouvent ainsi baignées de sang oxygéné maternel. Lorsque la pression diminue, le flux sanguin retourne de la plaque chorale à la plaque déciduale, et il pénètre dans les veines de l'endomètre d'où il retourne vers le compartiment maternel.

Une fois constitués, les lacs sanguins contiennent environ 150 cm<sup>3</sup> de sang qui se renouvelle trois à quatre fois par minute. La surface totale des villosités chorales est de 6 à 14 m<sup>2</sup>. Les échanges gazeux ont lieu seulement au niveau des villosités dont les vaisseaux fœtaux sont en contact intime avec la membrane syncytiale qui les recouvre. La *barrière placentaire* est constituée de quatre couches, à savoir:

- 1° la paroi endothéliale des vaisseaux fœtaux;
- 2° le tissu conjonctif axial (mésenchyme extra-embryonnaire) des villosités;
- 3° le cytotrophoblaste;
- 4° le syncytiotrophoblaste.

A partir du 4<sup>ème</sup> mois, cette barrière s'amincit du fait que la paroi endothéliale des vaisseaux vient au contact de la membrane syncytiale. Ceci permet une augmentation du taux des échanges. Puisque le sang maternel des chambres intervillieuses est séparé du sang fœtal par un dérivé du chorion, on dit que le placenta humain est de type *hémochorial*. Quelle que soit l'intensité des rapports materno-fœtaux, il n'y a jamais de communication directe entre la circulation maternelle et la circulation fœtale. Entre les deux s'interpose la barrière placentaire.

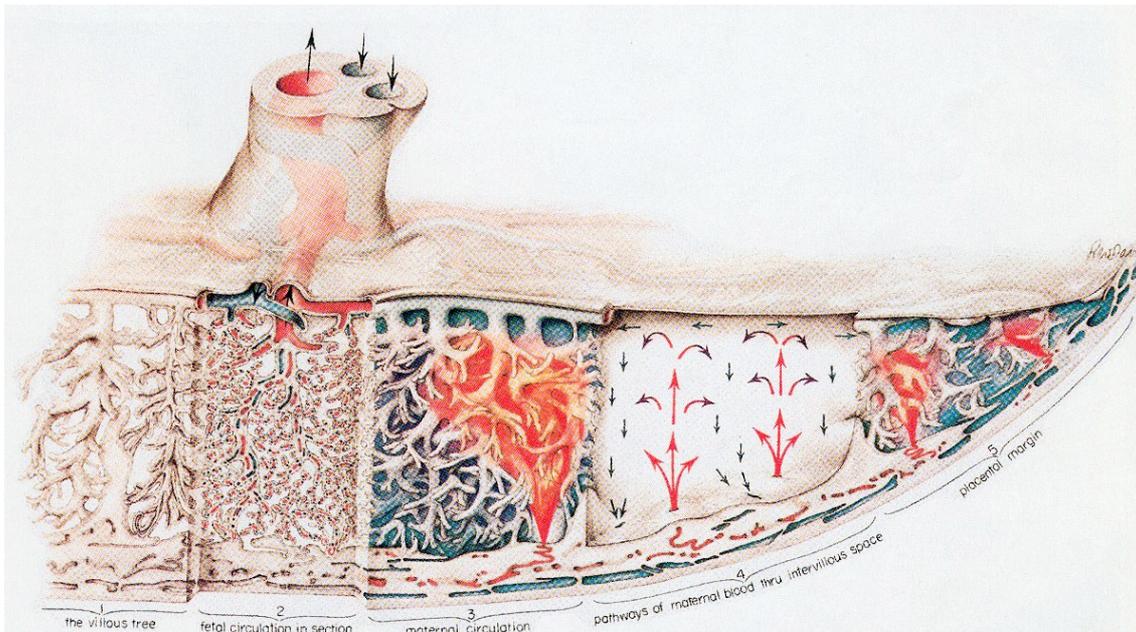


Fig. VII.6 - Schéma de la circulation sanguine intraplacentaire.

## PHYSIOLOGIE DU PLACENTA

### a) Echanges classiques:

- **Echanges gazeux** par diffusion ( $O_2$  de la mère au fœtus,  $CO_2$  du fœtus vers la mère).
- **Echanges nutritifs et électrolytiques.**
- **Transmission des anticorps maternels:** le fœtus acquiert une immunité *passive* contre certains virus. Les phénomènes d'incompatibilité Rhesus liée à l'antigène érythrocytaire Rh peuvent induire des agglutinations de globules rouges chez un fœtus  $Rh^+$  d'une mère  $Rh^-$ . La disparition des globules rouges fœtaux ou *erythroblastose fœtale* (ou *maladie hémolytique du fœtus*), suite au passage des anticorps maternels anti-Rh, peut conduire à une mort *in utero*.  
L'amniocentèse permet de détecter cette incompatibilité et d'éviter la mort par des transfusions intra-péritonéales de sang au fœtus par voie trans-utérine.

### b) Endocrinologie placentaire

Le syncytiotrophoblaste est un organe endocrine important pendant la plus grande partie de la grossesse. Il produit à la fois des stéroïdes et des hormones protéiques.

La 1ère hormone est la *gonadotrophine chorionique (hCG)* qui maintient la survie du corps jaune et la production de progestérone par celui-ci. La sécrétion culmine à la 8ème semaine, puis elle diminue progressivement. A la fin du 4ème mois, le placenta

produit suffisamment de progestérone et le corps jaune involue progressivement en corpus albicans. Le placenta ne peut cependant assurer lui-même l'aromatation des androgènes en œstrogènes et il agit alors de concert avec la surrénale et le foie fœtaux.

Le placenta produit aussi le *lactogène placentaire (HPL)* ou *somatomammotrophine chorionique (HCS)* qui contrôle la croissance, la lactation et le métabolisme glucido-lipidique.

Des travaux menés à l'Université de Liège ont permis d'identifier un variant placentaire de l'hormone de croissance. Celui-ci est exprimé sous le contrôle d'un gène différent (*hGH-V*), en particulier pendant la seconde moitié de la grossesse. Durant cette période, il a été montré que le variant placentaire de la GH pouvait remplacer l'hormone d'origine antéhypophysaire dans le contrôle du métabolisme maternel. En conditions physiologiques, le gène *hGH-V* n'est donc pas silencieux comme cela était supposé.

L'amnios, le chorion et la décidua humains sont également des sites d'expression du gène de l'*ocytocine*, un peptide de neuf acides aminés qui possède une activité utérotonique puissante. Les *stéroïdes* et les *cytokines* IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$  sont des stimulants de la synthèse déciduale d'ocytocine. Une communication locale (de type paracrine) entre ce signal et ses récepteurs exprimés par les cellules du myomètre utérin pourrait intervenir dans le déclenchement du travail au moment de l'accouchement.

D'une manière générale, le placenta semble dupliquer les différents systèmes de contrôle de la production hormonale intervenant au cours de la vie post-natale. Les cellules cytotrophoblastiques synthétisent un parent du facteur hypothalamique de libération des gonadotrophines (GnRH). Celui-ci gagne alors le syncytiotrophoblaste pour y stimuler la libération de l'HCG. Lorsque le corps jaune ovarien n'est plus fonctionnel, l'HCG intervient également dans le contrôle de la stéroïdogénèse placentaire.

### c) Immunologie du placenta

Nous avons déjà évoqué que l'absence de rejet du fœtus ou la tolérance immunitaire du fœtus par la mère demeure un des grands mystères de la grossesse.

Il semble acquis aujourd'hui que ni le syncytiotrophoblaste, ni la coque cytotrophoblastique n'expriment l'une des deux classes de protéines encodées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il sera montré au cours d'Immunologie que ces protéines jouent un rôle fondamental dans la présentation des antigènes aux cellules immunocompétentes. Le placenta exprime cependant des molécules du CMH de classe I particulières (HLA-G) qui peuvent se lier spécifiquement à des récepteurs

inhibiteurs (KIR) des cellules NK utérines (uNK). Les protéines du CMH sont exprimées par le fœtus et par les cellules interstitielles du placenta. Il en va de même pour certains antigènes mineurs d'histocompatibilité comme l'antigène HY chez les fœtus mâles. Enfin, des ruptures peuvent se produire au niveau de la barrière placentaire, ce qui aboutit à la libération de globules rouges et de leucocytes fœtaux dans la circulation maternelle.

L'hormone fondamentale de la gestation, la progestérone, n'induit pas de paralysie générale du système immunitaire maternel pendant la grossesse, mais relève néanmoins le seuil d'activation lymphocytaire. Il pourrait exister aussi une suppression sélective pour certains antigènes fœtaux dont les mécanismes sont complètement inconnus. La maladie hémolytique du fœtus plaide néanmoins contre ce type d'intervention.

Une dernière possibilité est que les cellules déciduales préviendraient la reconnaissance immunitaire du fœtus par la mère, ou le passage de cellules immunocompétentes maternelles vers le fœtus.

Cette question importante reste donc ouverte et est largement expérimentée aujourd'hui. La solution viendra peut-être de la recherche des mécanismes immunologiques impliqués éventuellement dans les avortements spontanés à répétition. Il est clair aussi que la compréhension de cette tolérance immunitaire de la greffe fœtale pourrait conduire à un meilleur contrôle du "rejet" observé dans les transplantations d'organes.

d) La barrière placentaire peut laisser passer des germes pathogènes (comme la plupart des virus comme le VIH, le spirochète de la syphilis), ou des drogues (thalidomide) qui peuvent provoquer des lésions fœtales graves et irréversibles.

#### *LE PLACENTA ET LES GROSSESSES MULTIPLES*

Les jumeaux dizygotes (issu de la fertilisation de deux ovules,  $\pm 60\%$  des cas de gémellarité) ou monozygotes résultant d'une séparation complète des blastomères très tôt au cours de la segmentation peuvent avoir des placentas et des membranes séparés si les deux embryons s'implantent à des endroits distants de la paroi utérine. Si les sites d'implantation sont proches, les placentas et les chorions (qui étaient initialement séparés lors de l'implantation) peuvent fusionner, bien que les systèmes vasculaires des deux embryons soient distincts.

Lorsque les jumeaux monozygotes se forment par division au sein de la masse cellulaire interne du blastocyste, il est fréquent d'avoir un placenta et un chorion

communs, mais les embryons jumeaux se développent dans des cavités amniotiques séparées. Dans ce cas, on peut voir des systèmes vasculaires séparés ou fusionnés au sein d'un même placenta. En cas de fusion, un jumeau peut se développer aux dépens de l'autre.

Chez les jumeaux conjoints (siamois) et plus rarement chez les jumeaux monozygotes résultant d'une séparation incomplète au sein de la masse cellulaire interne, les embryons se développent à l'intérieur d'une même cavité amniotique et possèdent un placenta de même qu'un approvisionnement sanguin communs.

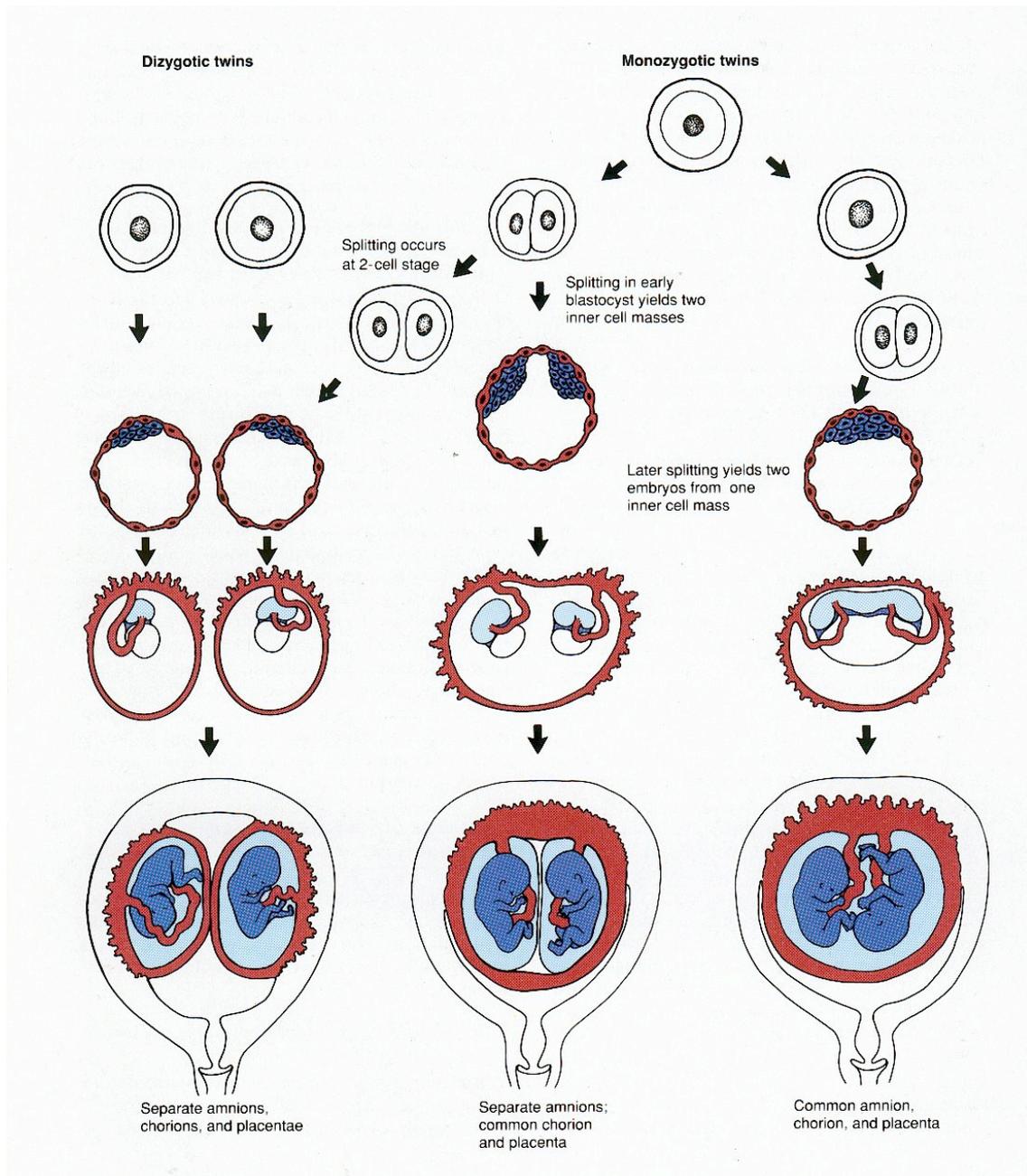


Fig. VII.7 - Dispositions intra-utérines de différents types de jumeaux et des placentas correspondants.

**VIII. Différenciation et diversité cellulaires (II) -  
Développement de l'ectoderme, du mésoderme  
et de l'endoderme.**

Chacun des trois feuillets mis en place lors de la gastrulation va, de la 3ème à la 8ème semaine du développement, donner naissance à un certain nombre de tissus et d'organes spécifiques. C'est la *période embryonnaire* au terme de laquelle les principaux appareils sont en place.

**I. DERIVES DE L'ECTODERME**

**La notochorde** (Voir Figure VIII.3)

Partant du nœud de Hensen, une population de cellules épiblastiques migrent à hauteur du mésoderme pour former en avant un prolongement appelé *chordomésoderme* ou *notochorde*. Ce dernier s'étend vers l'avant jusqu'à ce qu'il rencontre la plaque prochordale, une aire où ectoderme et endoderme sont étroitement accolés. Celle-ci représente le site de la future bouche.

D'un point de vue phylogénique et ontogénique, la notochorde fonctionne comme un des premiers tissus inducteurs de l'embryon, en particulier dans la transformation de portions de l'ectoderme embryonnaire en système nerveux. La recherche en embryologie comparée a démontré de manière convaincante que le nœud de Hensen est l'équivalent de la lèvre dorsale du blastopore chez l'embryon amphibien (voir auparavant). De la même manière que le chordomésoderme passe à travers la lèvre dorsale et migre sous l'ectoderme de l'embryon amphibien, la notochorde sert d'inducteur principal du système nerveux au cours du développement précoce de l'embryon. Les cellules du nœud de Hensen synthétisent de l'acide rétinoïque qui est un agent morphogène important.

## **L'induction primaire du système nerveux**

Dès 1900, l'intervention d'une relation inductrice entre chordomésoderme et l'ectoderme sus-jacent fut reconnue dans la genèse du système nerveux. Nous avons déjà vu que la greffe de la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon sous l'ectoderme ventral d'un autre, donnait naissance à un second système nerveux et à un axe corporel supplémentaire chez le greffé. Des expériences similaires réalisées à l'aide des cellules du nœud de Hensen chez les embryons d'Oiseaux et de Mammifères ont donné des résultats équivalents. Le nœud de Hensen et la notochorde agissent donc comme des inducteurs primaires, tandis que l'ectoderme sus-jacent constitue le tissu répondeur chez ces vertébrés.

La première réponse morphologique visible de l'embryon à cette induction primaire est la transformation de l'ectoderme dorsal sus-jacent en un épaissement allongé, la *plaque neurale*. A la suite de cette formation, l'ectoderme se répartit en deux lignées principales, neurale et non neurale. Cet exemple illustre quelques concepts fondamentaux du développement, comme la restriction, la détermination et la différenciation. Comme nous l'avons déjà vu plus haut, lorsqu'un groupe de cellules a franchi une certaine étape cruciale, leur sort est fixé et elles sont déterminées. Il y a une restriction, une limitation progressive de leurs capacités de différenciation. Le phénotype des cellules de la plaque neurale se caractérise d'ailleurs par une hauteur plus importante et une restriction dans l'expression des molécules d'adhésion. Les cellules de l'ectoderme pré-induit expriment en effet à la fois les molécules d'adhésion N-CAM et L-CAM. Les cellules de la plaque neurale n'expriment plus que N-CAM, tandis que l'expression de L-CAM est maintenue dans l'ectoderme non neuronal.

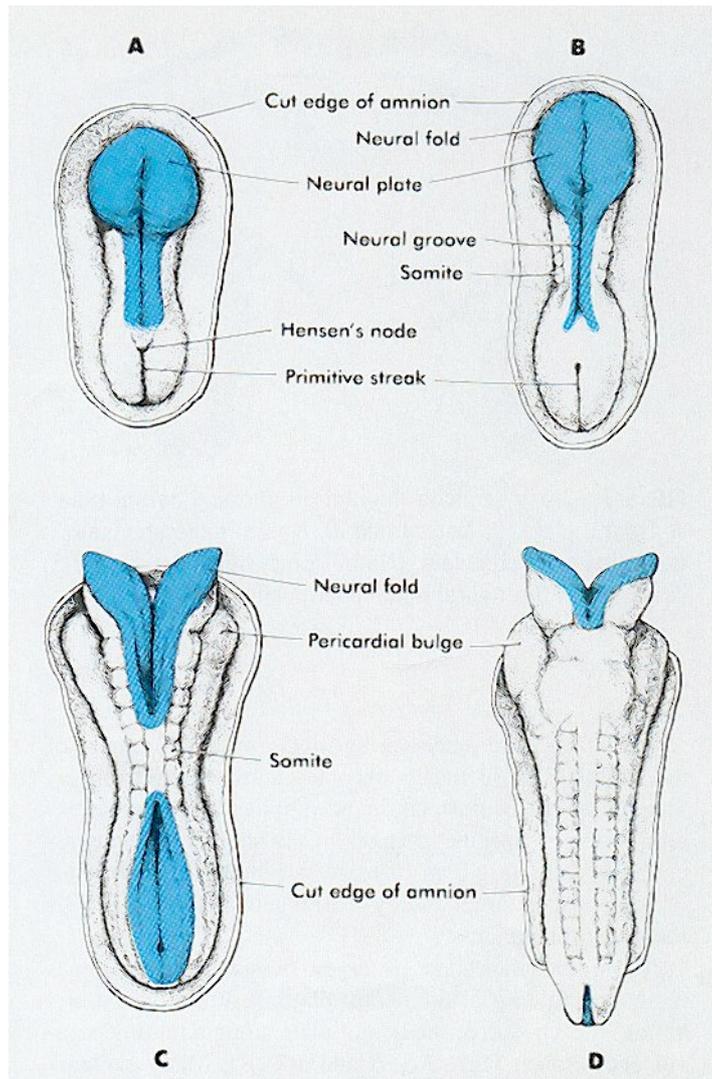


Fig. VIII.1 - *Etapes précoces de la neurulation.*  
*A, 18 jours. B, 20 jours. C, 22 jours et D, 23 jours.*

La deuxième étape de la neurulation est une élévation des bords latéraux de la plaque neurale le long d'un sillon médian, la *gouttière neurale*. Progressivement, les surfaces apicales des plis neuraux s'accolent, puis fusionnent. Cette fusion aboutit à la formation du *tube neural* qui débute au 21-22ème jour dans la future région cervicale, en se prolongeant ensuite vers l'avant et vers l'arrière (Fig. VIII.1 et 2). Les extrémités non closes céphaliques et caudales du tube neural s'appellent les *neuropores* antérieur et postérieur. Ceux-ci se fermeront normalement par après, sauf dans des cas pathologiques de malformations graves.

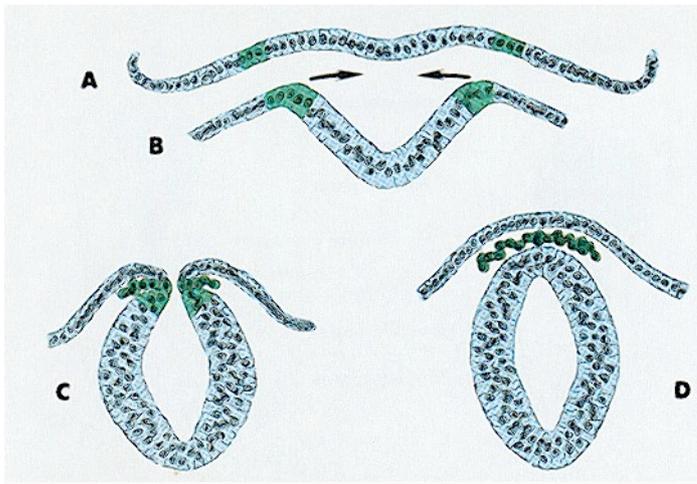


Fig. VIII.2 - *Sections transverses du tube neural en formation.*

- A. Plaque neurale
- B. Plis de la gouttière neurale
- C. Apposition des bords de la gouttière neurale
- D. Tube neural complet (les cellules de la crête neurale sont en vert).

### **Segmentation dans le tube neural**

Les premières subdivisions concernent l'extrémité crâniale qui présente trois dilatations successives, les *vésicules cérébrales* primitives. D'avant en arrière, on distingue: 1) le *proscéphale* ou cerveau antérieur; 2) le *mésencéphale* ou cerveau moyen; et 3) le *rhombencéphale* ou cerveau postérieur. Parallèlement à l'apparition des vésicules cérébrales, le tube neural s'infléchit ventralement formant deux courbures: la courbure cervicale, située à la jonction du cerveau postérieur et de la moelle épinière; et la courbure céphalique, située dans la région du cerveau moyen. Chez presque tous les embryons vertébrés, des segments réguliers apparaissent au niveau du rhombencéphale (Fig. VIII.3) : les *neuromères* (ou *rhombomères*). Pour certains expérimentateurs, ces derniers étaient une preuve que les vertébrés ont évolué à partir d'organismes ancestraux segmentés. Une fois établis, les rhombomères agissent comme des compartiments isolés des embryons d'insectes, et les cellules de neuromères adjacents ne se mélangent pas. L'étude de l'expression de gènes à homéoboîte chez les vertébrés a montré une étroite corrélation entre la localisation de certains gènes et des neuromères particuliers. Certains de ces gènes sont des membres du complexe *Hox-2* (*Hox-B*), *Krox-20*, *Wnt* et *engrailed*. Ces gènes pourraient spécifier l'identité des neuromères correspondants et leurs dérivés ultérieurs. Bien que des neuromères ne soient pas mis en évidence dans la région du tube neural dont dérive la moelle épinière, l'arrangement régulier des racines nerveuses sensibles et des nerfs moteurs est un argument en faveur d'une organisation segmentaire initiale dans cette région également.

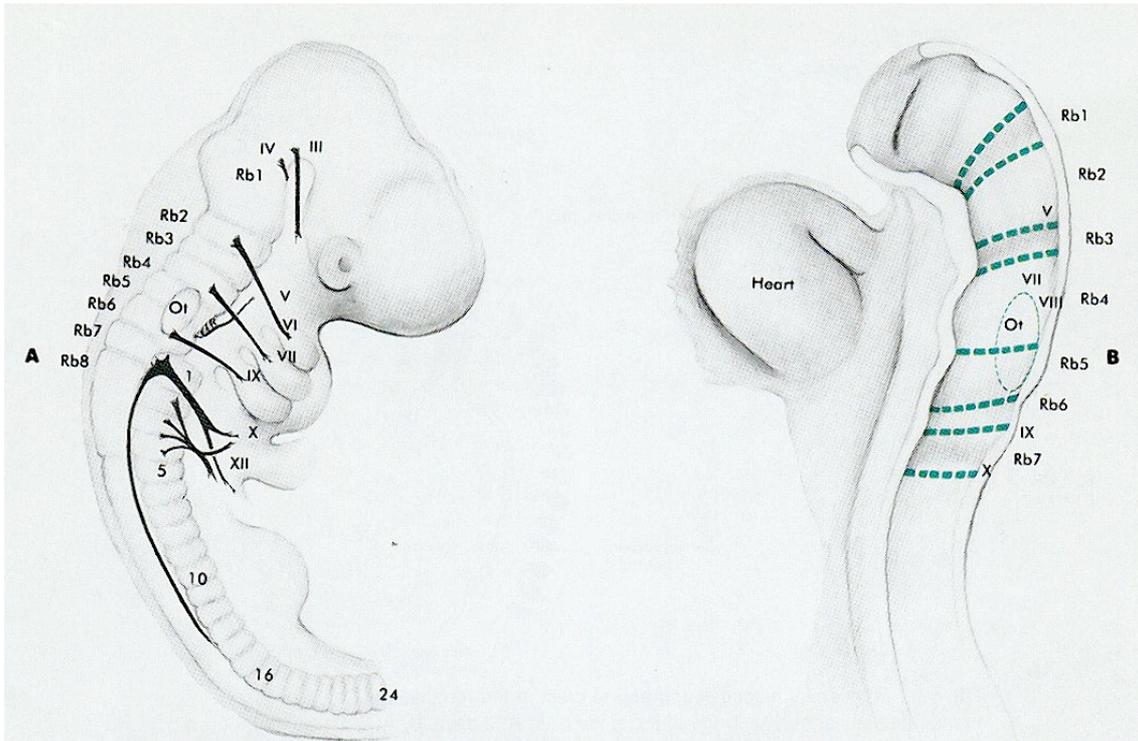


Fig. VIII.3 - Rhombomères dans (A) un embryon de poulet de 3 jours et (B) un embryon humain de 24 jours.

## La crête neurale

Au cours de la formation du tube neural, un groupe de cellules s'isole de chaque bord de la plaque neurale au moment de son invagination. Ces cellules, d'origine ectoblastique, constituent les cellules de la crête neurale et forment transitoirement une zone intermédiaire entre le tube neural et l'ectoblaste superficiel (Fig. VIII.2 et 4). La crête neurale intervient dans la formation d'un nombre important de structures de l'embryon, à tel point qu'elle est parfois appelée le *quatrième feuillet* germinal de l'embryon.

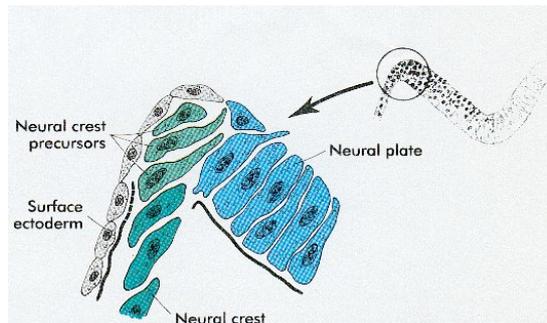


Fig. VIII.4 - Schéma montrant la formation de la crête neurale, de la gouttière neurale et du tube neural. Les cellules de la crête neurale initialement situées à l'union de la gouttière neurale et de l'ectoblaste superficiel, se détachent pour migrer en différents endroits de l'embryon.

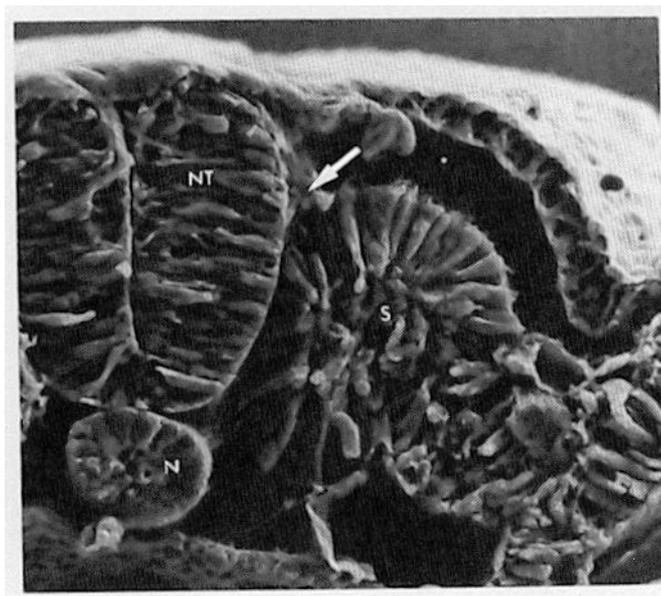


Fig. VIII.5 - Vue en microscopie électronique à balayage d'un embryon de poulet montrant la migration précoce des cellules de la crête neurale (flèche) hors du tube neural. N, notochorde ; S, somite.

Les cellules de la crête neurale, de type neuroépithélial au départ, se transforment progressivement en cellules mésenchymateuses. Parallèlement, cette transformation s'accompagne d'une perte de l'adhésion intercellulaire et ce phénomène contribue activement à la migration de ces cellules vers différentes zones de l'embryon (Fig. VII.5). Cette migration est favorisée par l'environnement riche en protéines de la matrice extracellulaire avec lesquelles les cellules vont interagir de manière concertée. Parmi les facteurs permissifs, on distingue des substrats contenant de la fibronectine, de la laminine, et certains types de collagène (de type IV, par exemple). L'attachement et la migration sur ces substrats sont médiés par une famille de protéines particulières appelées *intégrines*. Les membranes basales organisées se comportent comme des barrières qui guident les cellules migratoires de la crête neurale. D'autres protéines matricielles, comme les protéoglycans riches en sulfate de chondroïtine, ne sont pas de bons substrats pour la migration des cellules de la crête neurale.

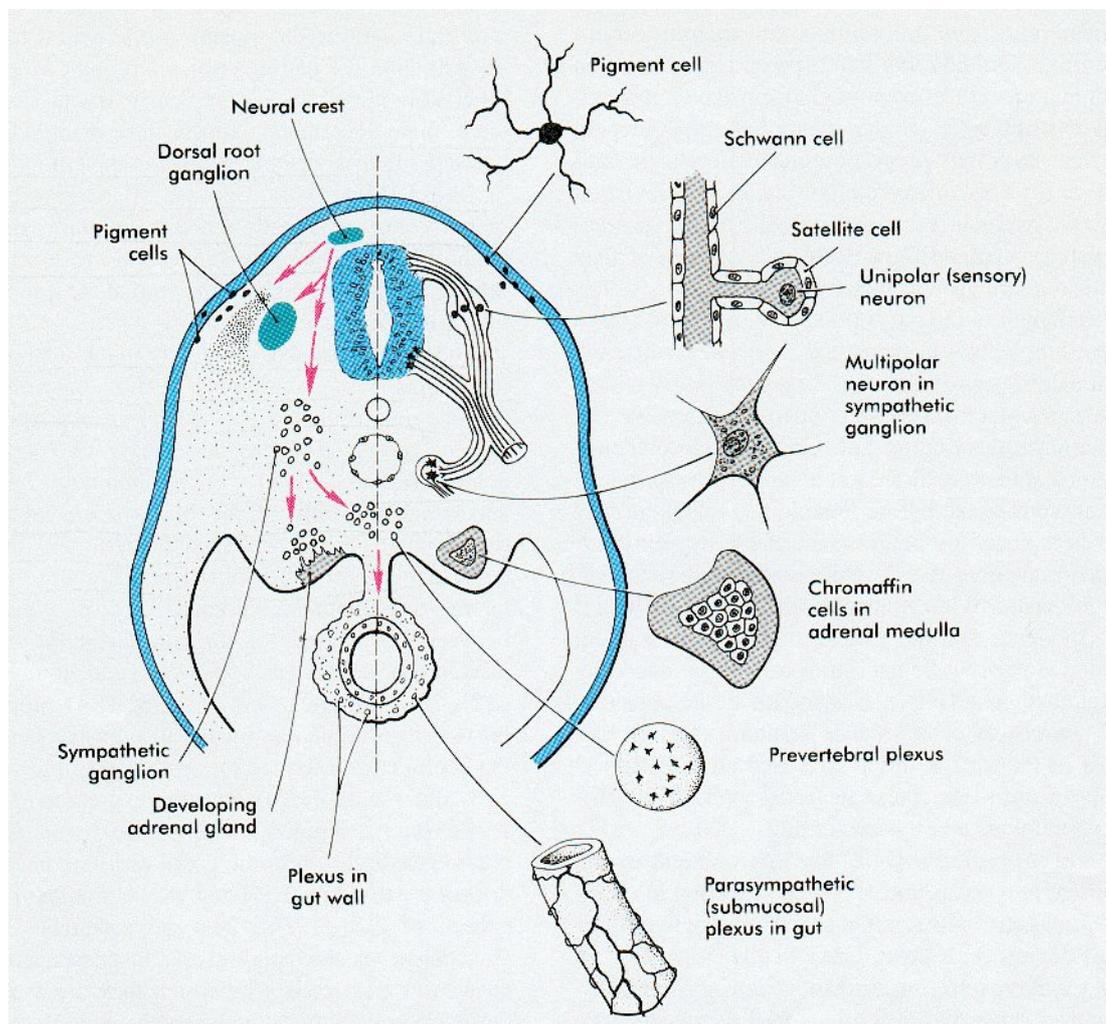


Fig. VIII.6 - *Voies principales de migration des cellules de la crête neurale.*  
A droite : principaux dérivés de la crête neurale tronculaire.

Les cellules de la crête neurale se différencient en un nombre étonnant de structures adultes (Tableau I). Deux hypothèses sont avancées pour expliquer la différenciation de la crête neurale. L'une propose que toutes ces cellules ont un potentiel de départ semblable et que leur différenciation est déterminée par l'environnement à travers lequel elles migrent et où elles s'installent. La deuxième suggère que les cellules sont programmées avant leur migration et que certaines cellules souches sont favorisées, tandis que le développement ultérieur d'autres est freiné pendant leur migration. La réponse définitive se situe probablement quelque part entre ces deux propositions.

A titre d'exemple, la sous-population sympathico-surrénalienne forme des cellules chromaffines de la médullosurrénale si elles sont exposées aux glucocorticoïdes du cortex surrénalien. Par contre, si elles sont d'abord exposées à du FGF (facteur de croissance fibroblastique) puis à du NGF (facteur de croissance neuronale), ces mêmes cellules deviennent des neurones sympathiques. La transformation chromaffine ne semble pas fixée toutefois, car ces cellules peuvent retrouver un phénotype neuronal si elles sont cultivées en présence de NGF même en postnatal. Les neurones sympathiques destinés à l'innervation des glandes sudoripares sont catécholaminergiques pendant leur développement, jusqu'à ce qu'ils entrent en contact avec les glandes et qu'ils deviennent alors cholinergiques.

TABLE 13-1 Major Derivatives of the Neural Crest		
	TRUNK CREST	CRANIAL CREST
Nervous system		
Sensory nervous system	Spinal ganglia	Ganglia of trigeminal nerve (V), facial nerve (VII), glossopharyngeal nerve (superior ganglion) (IX), vagus nerve, (jugular ganglion) (X)
Autonomic nervous system	Parasympathetic ganglia: pelvic plexus, visceral	Parasympathetic ganglia: ciliary, ethmoidal, sphenopalatine, submandibular, visceral
Nonneural cells	Satellite cells of sensory ganglia, Schwann cells of peripheral nerves, enteric glial cells	Satellite cells of sensory ganglia, Schwann cells of peripheral nerves, leptomeninges of prosencephalon and part of mesencephalon
Pigment cells	Melanocytes	Melanocytes
Endocrine and paraendocrine cells	Adrenal medulla, neurosecretory cells of heart and lungs	Carotid body (type I cells), parafollicular cells (thyroid)
Mesectodermal cells		
Skeleton	None	Cranial vault (squamosal and part of frontal), nasal and orbital, otic capsule (part), palate and maxillary, sphenoid (small contribution), trabeculae (part), visceral cartilages, external ear cartilage (part)
Connective tissue	None	Dermis and fat of skin; cornea of eye (fibroblasts of stroma and corneal endothelium); dental papilla (odontoblasts); connective tissue stroma of glands: thyroid, parathyroid, thymus, salivary, lacrimal; outflow tract (truncocoanal region) of heart; cardiac semilunar valves; walls of aorta and aortic arch-derived arteries
Muscle	None	Ciliary muscles, dermal smooth muscles, vascular smooth muscle, minor skeletal muscle elements (?)

Tableau I – Principaux dérivés des crêtes neurales céphalique et tronculaire.

Tableau 1 - *Dérivés principaux de la crête neurale*

	<b>Crête tronculaire</b>	<b>Crête céphalique</b>
<b>Système nerveux</b> SN sensoriel SN autonome	Ganglions spinaux Ganglions PS	Ganglions V, VII, IX et X Ganglions PS (ciliaires, ethmoïdes, sous-mandibulaires, viscéraux)
<b>Cellules non nerveuses</b>	C. satellites de ggl. spinaux C. de Schwann C. gliales entériques	C. satellites de ggl. C. de Schwann Leptoméninges prosencéph. Partie du mésencéphale
<b>Cellules pigmentaires</b>	Mélanocytes	Mélanocytes
<b>Cellules endocrines</b>	Médullo-surrénale C. neurosécrétrices du cœur et des poumons	Corpus carotidien Cellules parafolliculaires de la thyroïde
<b>Més ectoderme</b> Squelette	-----	Partie du frontal et os de la face Cartilages viscéraux Cartilage de l'oreille externe
Tissu conjonctif	-----	Derme et t. adipeux de la peau; cornée; papille dentaire (odontoblastes); t. conjonctif thyroïde, parathyroïdes, thymus, glandes salivaires et lacrymales; parois des artères dérivées de l'arc aortique.
Muscle	-----	Muscles ciliaires, du derme, muscles lisses vasculaires.

Une observation importante qui se dégage à la lecture de ce tableau est que les cellules de la crête neurale céphalique ont des potentialités de différenciation plus importantes que celles dérivant de la région tronculaire.

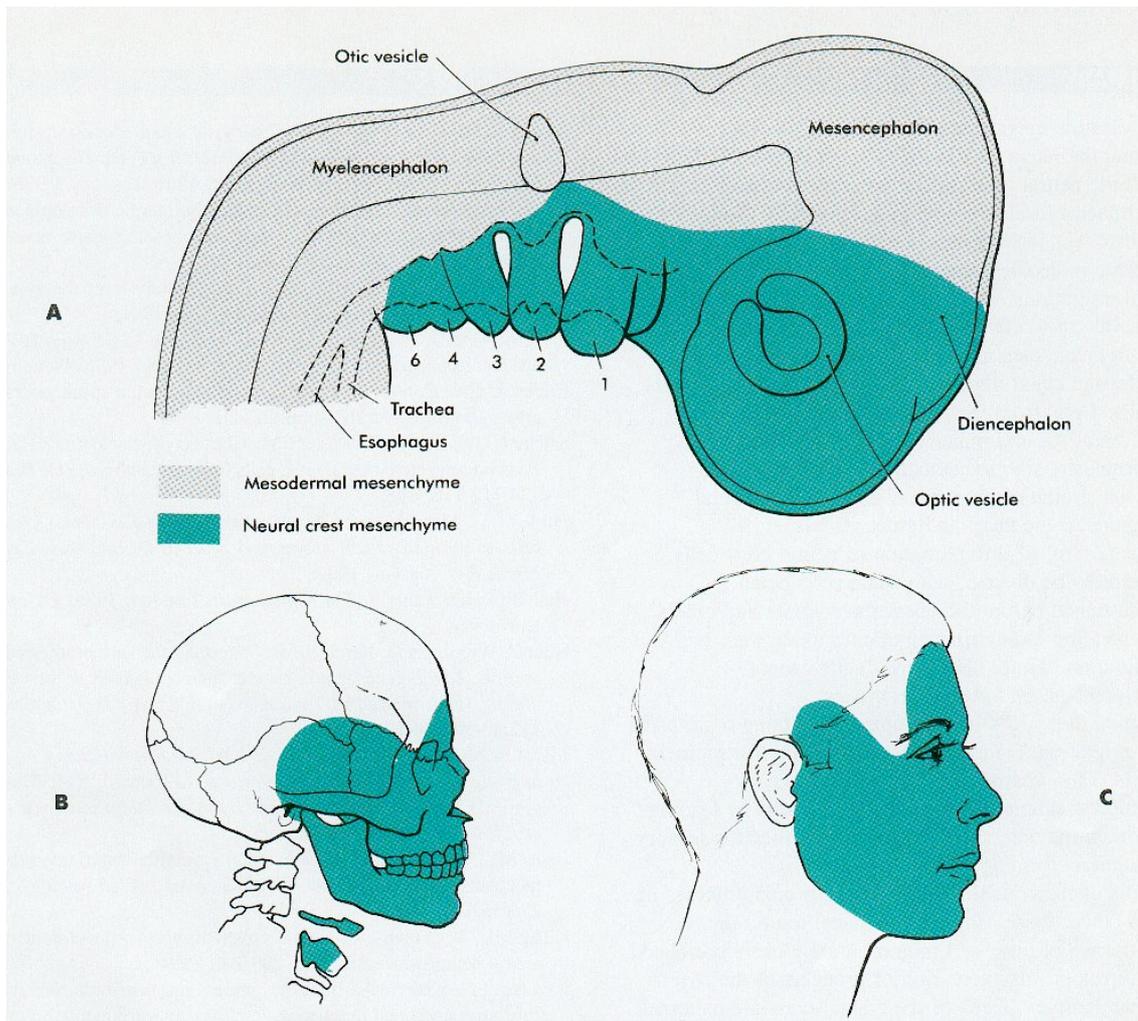


Fig. VIII.7 - *Distribution de la crête neurale dans la tête et le cou.*  
 A. Chez l'embryon précoce.  
 B et C. Dans le squelette et le derme de la face chez l'adulte.

### **Placodes sensorielles et inductions secondaires dans la région céphalique**

Au moment de la fermeture du tube neural, on voit apparaître à la partie céphalique de l'embryon deux épaissements ectoblastiques: la *placode otique* et la *placode optique*. Ultérieurement, la placode otique s'invagine pour former la cupule otique. Vers la fin de la 4ème semaine, elle se ferme par prolifération de l'ectoderme superficiel donnant naissance à la *vésicule otique*.

La placode optique va aussi s'invaginer et, au cours de la 5ème semaine, prendre contact avec l'ectoblaste superficiel pour former le *cristallin*.

## II. DERIVES DU MESODERME

Au début, les cellules du mésoblaste forment une mince couche de tissu de chaque côté de la ligne médiane. Vers le jour 17, un certain nombre de cellules jouxtant la ligne médiane prolifèrent et forment une plaque épaisse, le mésoderme para-axial. Plus latéralement, le mésoblaste reste peu épais et constitue la lame latérale. Celle-ci se clive en deux couches: 1) l'une est en continuité avec le mésenchyme extra-embryonnaire tapissant l'amnios: c'est la *somatopleure* intra-embryonnaire; 2) l'autre est en continuité avec le mésenchyme tapissant la vésicule vitelline: c'est la *splanchnopleure* intra-embryonnaire. A elles deux, ces couches limitent une nouvelle cavité: le coelome interne, lequel, de chaque côté de l'embryon, s'ouvre dans le coelome externe. Le tissu, qui unit au début le mésoderme para-axial et la lame latérale, est appelé *mésoderme intermédiaire*.

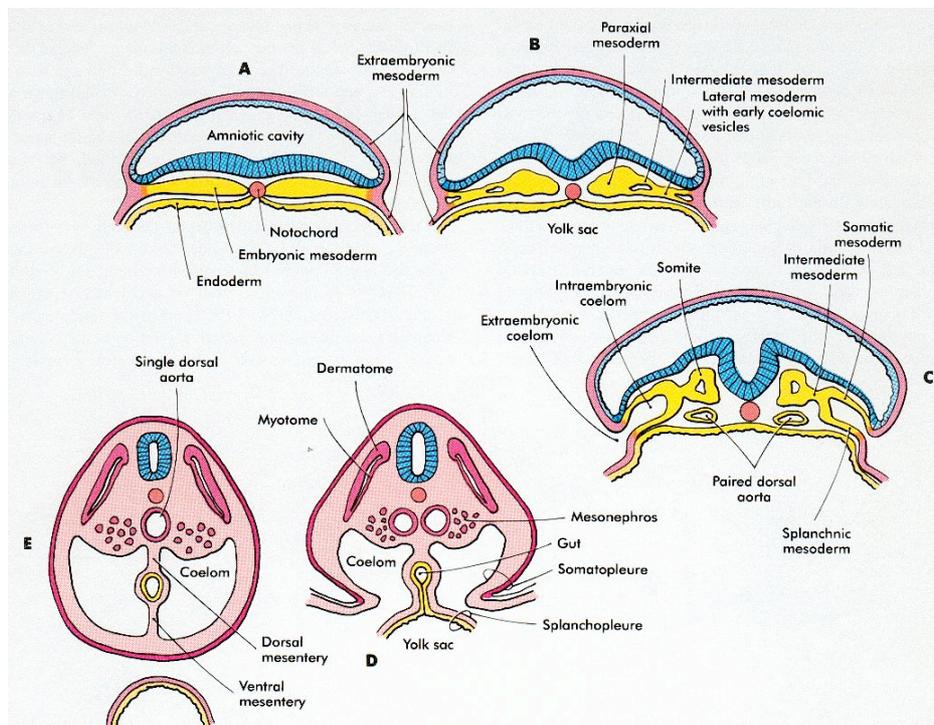


Fig. VIII.7 - Développement du mésoderme en coupes transversales.

Vers le début de la 3ème semaine, le mésoderme para-axial s'organise en segments, ou *somatomères*. Ces derniers apparaissent d'abord dans la région céphalique, puis la métamérisation se poursuit en direction cranio-caudale. Chaque somatomère est constitué de masses de cellules mésoblastiques entourées autour d'un axe central. Dans la région céphalique, elles fournissent, en association avec le neuromère correspondant,

la plus grande part du mésenchyme céphalique. A partir de la région occipitale puis vers la région caudale, les somatomères s'organisent ensuite en *somites*. A la fin de la 5ème semaine, on compte 42 à 44 paires de somites: 4 paires de somites occipitaux, 8 de somites cervicaux, 12 de somites thoraciques, 5 de somites sacrés, 8 à 10 de somites coccygiens. La première paire de somites occipitaux et les 5 à 7 dernières paires coccygiennes disparaissent. Les autres forment le squelette axial.

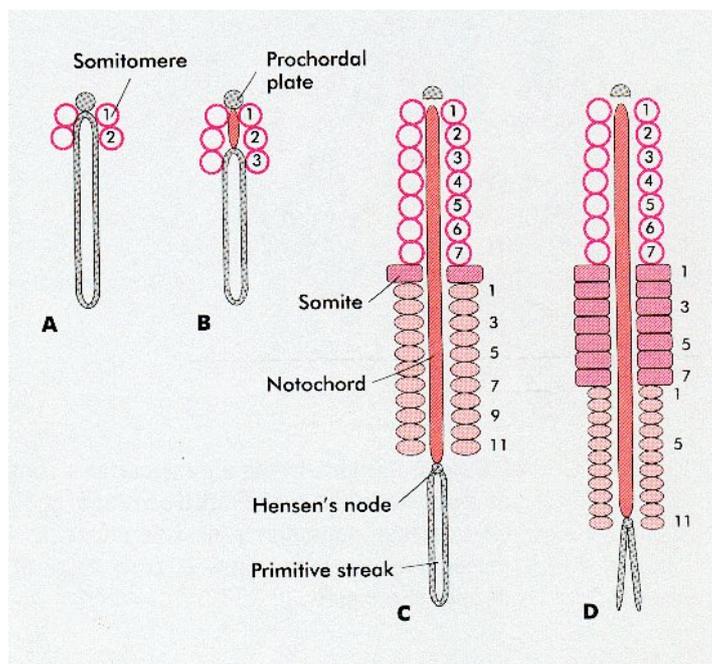


Fig. VIII.8 - Relations entre somatomères et somites dans l'embryon de poulet.

Les somatomères crâniens (cercles ouverts) se forment le long du nœud de Hensen jusqu'à ce que 7 paires soient formées. En position caudale par rapport au 7<sup>e</sup> somatomère, les somites (rectangles) se forment à partir des somatomères postérieurs (ovales). Au fur et à mesure que les plus antérieurs des somatomères caudaux se transforment en somites, de nouveaux somatomères caudaux apparaissent. Pendant un moment, l'équilibre entre transformation en somites antérieurs et nouvelle formation en arrière maintient le nombre de somatomères arrières au nombre de 11.

### Différenciation du somite (Fig. VIII.9)

Vers la 4<sup>e</sup> semaine, les cellules épithélioïdes des parois médiale et ventrale du somite deviennent polymorphes et migrent autour de la corde dorsale. L'ensemble de ces cellules forme le *sclérotome*, un tissu mésenchymateux qui va entourer la moelle épinière et la corde dorsale pour former la colonne vertébrale.

La partie dorsale restante du somite constitue le *dermomyotome*. Elle donne naissance à une nouvelle couche de cellules par sa face interne, le *myotome*, qui fournira les éléments musculaires du segment métamérique correspondant. Après formation de celui-ci, les cellules somitiques résiduelles se dispersent sous l'ectoderme sus-jacent et vont former le derme ainsi que le tissu sous-cutané. Ainsi chaque somite forme dans son segment métamérique un *sclérotome* (os et cartilage), un *myotome* (muscle) et un *dermatome* (tégument).

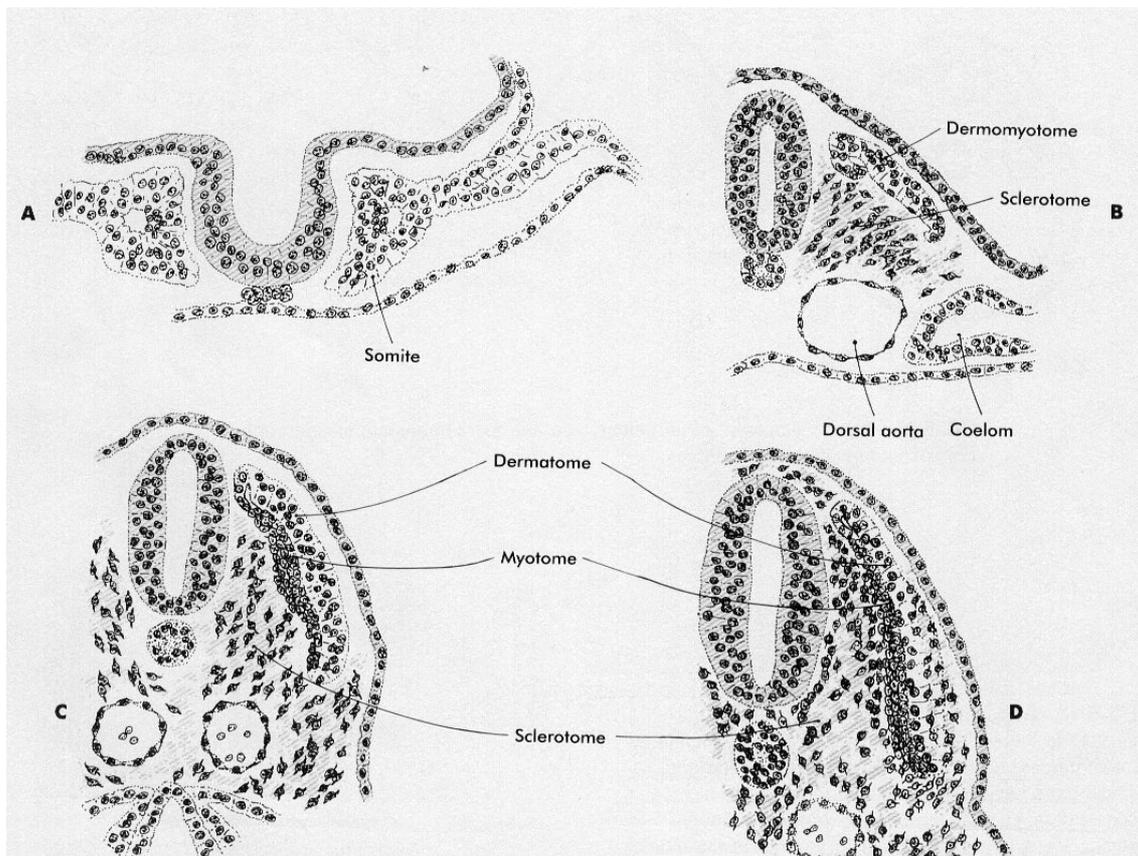


Fig. VIII.9 - Etapes successives du développement d'un somite.

- A. Stade épithélial d'un somite au moment de la formation du tube neural.
- B. Transformation épithélio-mésenchymateuse de la portion ventromédiale en sclérotome.
- C. Apparition d'un myotome distinct.
- D. Stade initial de la formation de fibroblastes du derme à partir du dermatome épithélial.

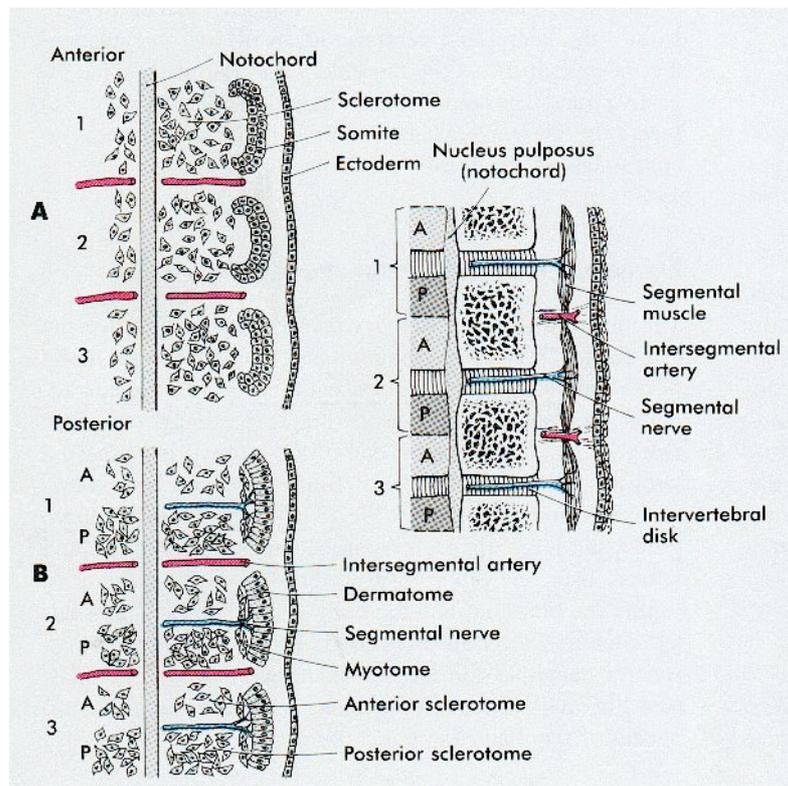


Fig. VIII. 10 –

- A. Mouvement précoce des sclérotomes à partir des somites.
- B. Séparation des sclérotomes en partie antérieure (A) et postérieure (P), et formation des corps vertébraux.
- C. Les muscles segmentaux (dérivés des myotomes)

### **Mésoderme intermédiaire** (Fig. VIII.7)

Ce tissu se différencie d'une toute autre façon. Dans les régions cervicale et thoracique supérieure, ils forment des amas cellulaires segmentés de façon métamérique: les futurs *néphrotomes*. Dans les régions plus caudales, ils forment une masse non segmentée que l'on appelle le cordon néphrogène. Les unités sécrétoires du système urinaire se formeront plus tard à partir de cette pièce intermédiaire du mésoderme.

### **Somatopleure et splanchnopleure** (Fig. VIII.7)

La somatopleure forme avec l'ectoblaste les parois latérale et ventrale de l'embryon. La splanchnopleure forme avec l'endoderme la paroi du tube digestif. Leur surface forme une mince membrane, membrane mésothéliale ou séreuse, qui tapissera les cavités péritonéales, pleurale et péricardique.

### **Sang et vaisseaux**

Vers le milieu de la 3<sup>e</sup> semaine, certaines cellules mésodermiques situées dans la paroi de la vésicule vitelline se différencient en cellules vasculo- et sanguino-formatrices. Ces angioblastes se disposent en cordons isolés qui se creusent par confluence de fissures intercellulaires pour devenir des vaisseaux. Les cellules situées au centre donnent naissance aux cellules sanguines primitives, et celles situées en périphérie forment les cellules endothéliales limitant les îlots sanguino-formateurs.

Pendant ce temps, cellules sanguines et capillaires se développent aussi dans le mésoderme extra-embryonnaire des villosités placentaires et de la vésicule vitelline. Par bourgeonnement continu, les vaisseaux extra-embryonnaires entrent en connexion avec les vaisseaux intra-embryonnaires faisant ainsi communiquer la circulation embryonnaire et la circulation au sein des villosités placentaires. Le sang et les vaisseaux intra-embryonnaires, y compris le tube cardiaque, se mettent en place selon un processus superposable à ce qui se passe pour les vaisseaux extra-embryonnaires.

En résumé, les dérivés du mésoderme sont les suivants:

- 1) Tissus de soutien (conjonctif, os et cartilage).
- 2) Muscles striés et lisses.
- 3) Cellules sanguines et lymphatiques.
- 4) Reins, gonades et canaux excréteurs.
- 5) Glande cortico-surrénale.
- 6) Rate.

### III. DERIVES DE L'ENDODERME

La vocation de l'endoderme (ou entoblaste) est essentiellement épithéliale: épithéliums *digestifs* (tractus digestif, glandes annexes et dérivés pharyngiens, sac vitellin) et *respiratoires* (branchies internes, poumons, allantoïde). Comme nous l'avons vu plus haut, la splanchnopleure l'entoure d'un manchon mésenchymateux qui se différencie en tissus conjonctifs et musculaires (le plus souvent lisses) formant la charpente conjonctive de différentes structures annexes.

Expérimentalement, on a pu établir que la différenciation d'un épithélium entoblastique d'un embryon de poulet est déterminée par la qualité du mésenchyme de tractus digestif qui lui est associé. Par exemple, un épithélium entoblastique de 3-4 jours associé à:

- du mésenchyme œsophagien de 6 jours se différencie en épithélium pluristratifié de type œsophagien;
- du mésenchyme gastrique forme un complexe glandulaire de type gastrique;
- du mésenchyme duodéal forme des structures villeuses avec des cellules prismatiques simples de type duodéal.

L'identité des molécules responsables de la spécificité de l'influence inductrice du mésenchyme n'est pas encore connue. Divers arguments plaident en faveur de molécules de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, laminine, ténascine) et de la membrane basale (laminine, collagène de type IV, protéoglycan de sulfate d'héparine), de même que certains facteurs de croissance (TGF $\beta$ ) ou leurs dérivés.

La formation du tube digestif, principal dérivé de l'entoblaste, est due à la plicature céphalo-caudale et latérale de l'embryon. L'inflexion céphalo-caudale provient de la croissance rapide du système nerveux central; l'inflexion latérale est liée à la croissance des somites. La formation du tube digestif consiste en l'incorporation passive d'une partie de la vésicule vitelline dans la cavité du corps de l'embryon. Au début, il existe une communication large entre l'embryon et la vésicule ombilicale. Cette communication va progressivement se rétrécir pour devenir l'étroit *canal vitellin* ou *omphalo-mésentérique*.

Au niveau céphalique, l'entoblaste du toit de la vésicule vitelline forme l'intestin antérieur, temporairement fermé par la *membrane prochordale* (ou *pharyngienne*), membrane didermique faite d'ectoblaste et d'entoblaste. A la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine, la

membrane pharyngienne se rompt, mettant en connexion la cavité amniotique et l'intestin primitif. L'intestin postérieur se termine lui à la *membrane cloacale*.

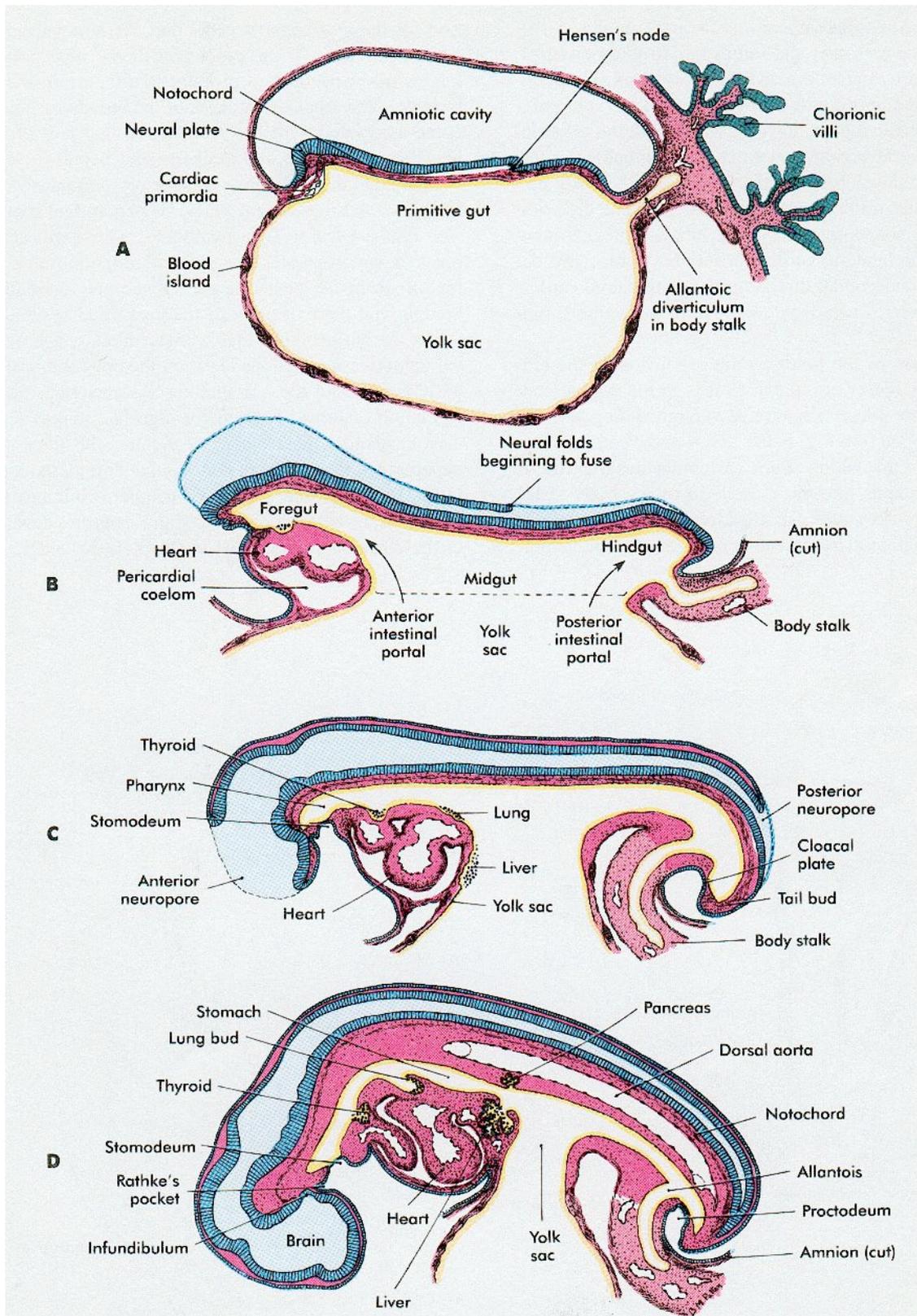


Fig. VIII.11 - Sections sagittales d'embryon humain montrant la mise en place progressive du système digestif. *A*, jour 16. *B*, jour 18. *C*, jour 22. *D*, à la fin du 1er mois.

Il existe aussi un repliement de l'embryon selon l'axe antéro-postérieur, de même qu'une plicature latérale.

Par suite de la formation du pli caudal de l'embryon, l'*allantoïde* s'incorpore en partie dans le corps et forme le *cloaque*. Chez la plupart des mammifères et les oiseaux, l'allantoïde représente une adaptation structurale majeure pour les échanges gazeux et l'élimination des déchets urinaires. En raison de l'efficacité du placenta, l'allantoïde ne se développe pas très fort dans l'embryon humain. Une fonction respiratoire accessoire persiste pour les vaisseaux qui se différencient à partir de la paroi mésodermique de l'allantoïde. La partie distale de l'allantoïde demeure dans le pédicule embryonnaire. A la fin de la 4ème semaine, la vésicule ombilicale et le pédicule embryonnaire fusionnent pour former le cordon ombilical. Chez l'homme, la vésicule ombilicale est vestigiale et son rôle nutritionnel est certainement limité aux premiers stades du développement. Au cours du 2ème mois, on la trouve habituellement sur le trajet du cordon ombilical.

Ainsi, l'endoderme forme initialement le revêtement épithélial de l'intestin primitif et des portions intra-embryonnaires de l'allantoïde et du lécithocèle. Au cours du développement ultérieur, il donne naissance:

- 1) à l'épithélium respiratoire;
- 2) au parenchyme de la thyroïde, des parathyroïdes, du foie et du pancréas;
- 3) au stroma réticulaire de l'amygdale et du thymus;
- 4) à l'épithélium d'une partie de la vessie et de l'urètre;
- 5) à l'épithélium de la caisse du tympan et de la trompe d'Eustache.

## Glandes annexes du tube digestif

Elles proviennent du bourgeonnement plus ou moins complexe de l'épithélium entoblastique dans son manchon mésenchymateux et elles s'organisent en structures annexes du tube digestif avec lequel elles communiquent par un ou plusieurs canaux excréteurs.

### *A. Glandes salivaires*

Le bourgeon initial est divisé en deux lobes suite à la présence de fibrilles de collagène I et III, sécrétées par les cellules mésenchymateuses de la future charpente conjonctive de la glande. En culture, une ébauche de glande sous-maxillaire de souris de 12 jours se développe normalement et se différencie en trois lobes endéans 24 heures. L'addition de collagénase au milieu de culture n'inhibe pas la croissance de l'ébauche, mais empêche son arborisation. Inversement, l'addition d'un inhibiteur de la collagénase permet un branchement surnuméraire d'une dizaine de lobules et augmente le nombre de fibrilles de collagène. Ces dernières pourraient stabiliser la membrane basale épithéliale et la protéger contre une hyaluronidase sécrétée par les cellules mésenchymateuses.

Dans ce modèle d'interactions réciproques entre mésenchyme et épithélium, l'épithélium synthétiserait les matériaux de la membrane basale et stimulerait la synthèse de collagène par le mésenchyme. En retour, le mésenchyme stimulerait la croissance de l'épithélium, modifierait localement la basale et déposerait les fibrilles de collagène.

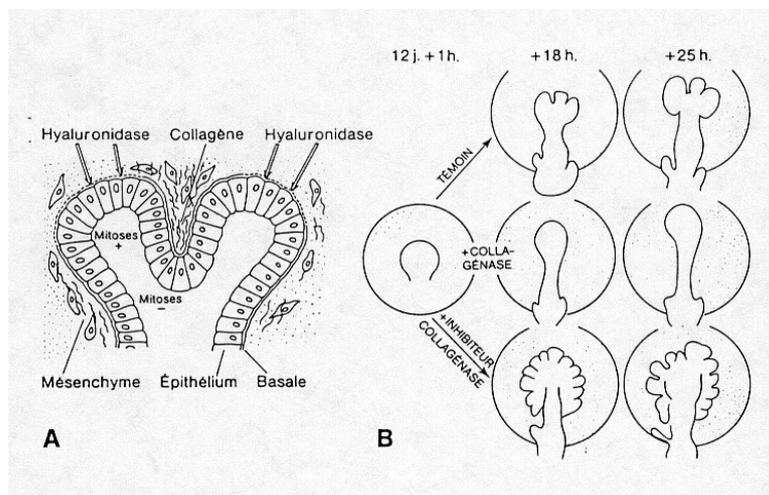


Fig. VIII.12 - Formation et arborisation d'une glande salivaire.

### B. Foie (Fig. VIII.13)

Foie et pancréas proviennent d'un épaississement annulaire de l'entoblaste (l'*anneau hépato-pancréatique*) qui apparaît à la limite intestin antérieur - intestin moyen (3<sup>e</sup> semaine de gestation). Un peu plus tard (25<sup>e</sup> jour), il donne naissance à quatre bourgeons épithéliaux qui restent reliés à l'intestin par un pédicule: le bourgeon ventral est hépatique, les bourgeons latéraux et le bourgeon dorsal sont pancréatiques.

Pendant leur prolifération au sein du mésenchyme adjacent, les cordons hépatiques incorporent en leur sein les veines vitellines qui vont former le système porte hépatique.

Le mésenchyme intra-hépatique est colonisé (5-6<sup>e</sup> semaine) par une vague de cellules souches hématopoïétiques provenant de la paroi du sac vitellin. Chez l'homme, le foie est l'organe hématopoïétique principal pendant le second trimestre de la grossesse. Cette activité régresse ensuite et s'épuise vers la fin du 7<sup>e</sup> mois pour disparaître généralement peu après la naissance. Elle peut toutefois être restaurée chez l'adulte pendant certaines maladies (anémies congénitales, syndromes myéloprolifératifs, leucémies avancées, lymphomes).

Les cellules entoblastiques du bourgeon hépatique requièrent deux interactions inductrices pour se différencier en hépatocytes.

- Une première induction par le mésoblaste cardiaque, qui assure leur prolifération.
- Une seconde induction par le mésenchyme lâche du septum transverse qui assure leur différenciation en hépatocytes, caractérisés par l'accumulation de particules de glycogène.

### C. Pancréas (Fig. VIII.13)

Au cours de l'embryogenèse, une ébauche dorsale puis une ébauche ventrale bourgeonnent au niveau de la paroi du futur duodénum. Le pancréas provient donc de deux évaginations de l'intestin primitif et a une origine endodermique.

L'expression par les cellules pancréatiques endocrines de protéines caractéristiques de neurones a poussé certains auteurs (Pearse, Teitelman) à proposer une origine neuroectodermique pour les cellules pancréatiques endocrines. Cette hypothèse a été confirmée par certaines expériences étudiant l'ontogénie de l'expression d'un hybride du gène de l'insuline, mais est invalidée par d'autres comme la greffe de crête neurale de caille à l'embryon de poulet.

Au cours du développement sont d'abord synthétisés le glucagon, puis l'insuline, suivis de la somatostatine et du polypeptide pancréatique. Au début, il existe une coexpression de différentes hormones dans les cellules endocrines du pancréas. Par la suite, ces cellules endocrines n'expriment plus qu'une seule hormone et elles se regroupent pour former les îlots de Langerhans.

### 1. Pancréas exocrine

Chaque bourgeon pancréatique peut proliférer et donner une ébauche formée de cordons épithéliaux pleins qui se ramifient au sein du mésenchyme puis se creusent en tubes qui commencent à se ramifier. Les différentes enzymes pancréatiques apparaissent successivement au cours de la différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules exocrines.

### 2. Pancréas endocrine

La formation du tissu endocrine (*îlots de Langerhans*) au sein du tissu exocrine est un phénomène complexe et non encore clairement compris. Deux hypothèses sont généralement admises, soit une différenciation spécifique à partir de l'ébauche entoblastique initiale, soit une migration de cellules d'origine neurectodermique. En faveur de cette dernière possibilité, on trouve notamment des expériences récentes réalisées chez des souris transgéniques pour le gène de l'insuline. Les premières cellules exprimant le transgène ont été identifiées dans le neurectoderme avant de migrer au sein de l'ébauche pancréatique endodermique. On retiendra aussi que le facteur de croissance neuronale (NGF) constitue un facteur important pour le maintien du phénotype des cellules endocrines insulaires lorsque celles-ci sont cultivées en milieu dépourvu de sérum.

Chez les mammifères, les quatre hormones pancréatiques sont cosynthétisées non seulement dans une même cellule plurihormonale (précurseur commun de toutes les cellules insulaires monohormonales de l'adulte) mais aussi dans les mêmes grains de sécrétion. Les premières cellules monohormonales sont les cellules à polypeptide pancréatique suivies des cellules à somatostatine. Les cellules monohormonales à insuline et à glucagon n'apparaissent qu'un peu avant la naissance chez l'homme.

Le premier facteur transcriptionnel intervenant dans la différenciation du pancréas endocrine est le facteur PDX-1 (**pancreatic-duodenal homeobox factor-1**), appelé aussi STF-1, IPF-1 ou encore IDX-1. Si le gène de PDX-1 est inactivé par KO, le pancréas ne se développe pas à l'exception des cellules  $\alpha$  sécrétrices du glucagon des îlots de Langerhans. PDX-1 est donc considéré comme un signal nécessaire pour la

détermination de l'endoderme intestinal qui deviendra le pancréas. D'autres facteurs sont exprimés dans les cellules pancréatiques comme les protéines à homéodomaines Pax4, Pax6, Is11, Nkx6, ou les facteurs « hélice-boucle-hélice » Beta2/NeuroD et PTF1.

Les facteurs Pax4, Pax6, Is11 et Beta2/NeuroD sont aussi exprimés dans les cellules neuronales. Le facteur PTF1 est restreint aux cellules du pancréas exocrine. L'inactivation de Pax6 induit une absence des cellules  $\alpha$  et un dispersement des cellules exocrines. La délétion de Pax4 conduit à une absence de cellules  $\beta$  et  $\delta$ , et à une prolifération massive des cellules  $\alpha$ . Une absence d'îlots est constatée lors de l'inactivation de *Is11* et le phénotype des souris « knock-out » pour Beta2/NeuroD se caractérise par l'absence d'îlots bien que les cellules endocrines se différencient normalement avec néanmoins une diminution du nombre de cellules  $\beta$ .

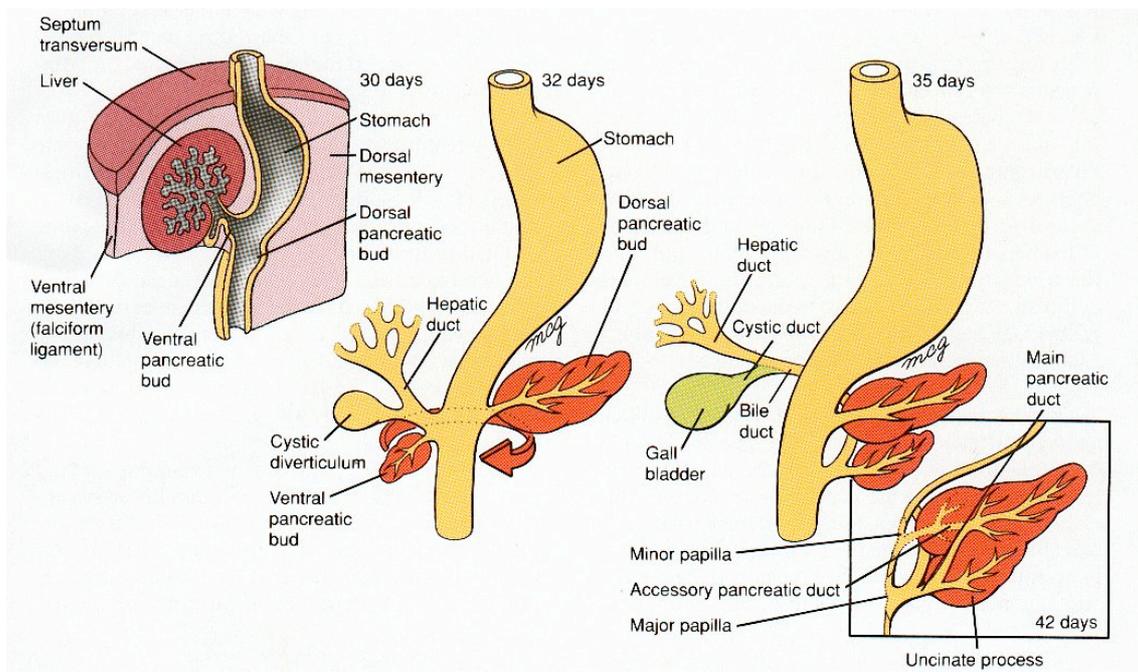


Fig. VIII.13 - Développement du foie et du pancréas.

## Dérivés pharyngiens

Le développement de la tête et du cou est marqué par l'apparition de l'*appareil branchial*. Les *arcs branchiaux* se forment à la 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> semaines du développement et donnent à l'embryon un aspect extérieur caractéristique. Au début, ce sont des bandes de tissu mésenchymateux dense séparés par de profonds sillons, les *fentes branchiales ectoblastiques*. Simultanément, des évaginations apparaissent en regard au niveau de la paroi latérale de l'intestin pharyngien (les *poches branchiales entoblastiques*). Ces poches s'enfoncent dans le mésenchyme, mais n'entrent pas en contact avec les fentes ectoblastiques. Le développement de l'appareil branchial de l'embryon humain rappelle donc le développement des fentes branchiales des poissons et des amphibiens, mais il ne se forme à aucun moment de véritables fentes branchiales.

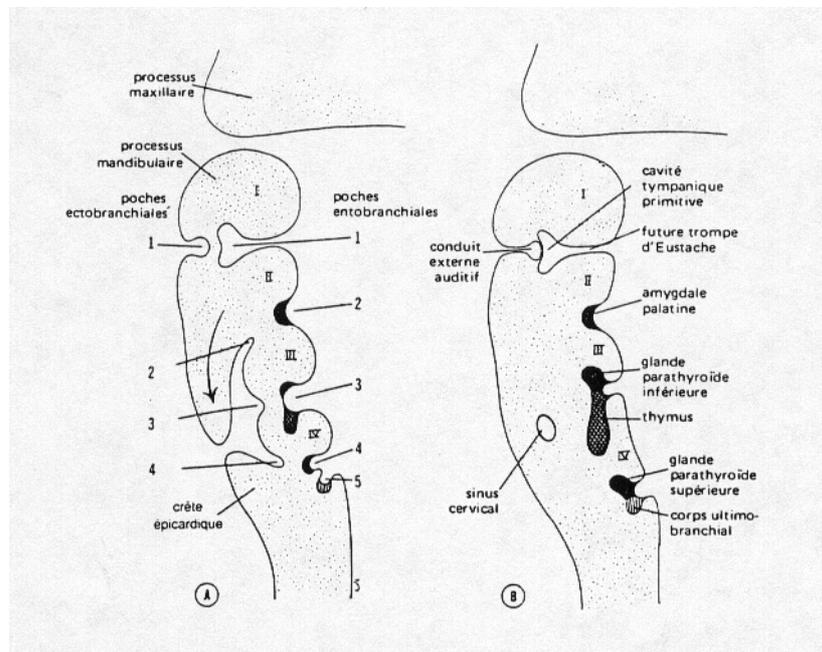


Fig. VII.14 - Développement schématique des poches branchiales ecto- et endoblastiques.

L'entoblaste pharyngien produit des bourgeons épithéliaux qui s'isolent et se différencient en glandes endocrines ou en organes lymphoïdes. Deux territoires pharyngiens manifestent ces potentialités: le plancher pharyngien antérieur d'où s'évagine la thyroïde, et les parois des poches pharyngées d'où se détachent le thymus et les corpuscules épithéliaux (parathyroïdes et corps ultimo-branchiaux).

### A. La thyroïde, dérivé du plancher pharyngien

Elle apparaît, à la 3<sup>e</sup> semaine du développement, sous forme d'une prolifération épithéliale dans le plancher de l'intestin pharyngien, en un point qui sera marqué plus tard par le foramen caecum. Par la suite, l'ébauche thyroïdienne s'enfonce dans le mésoblaste sous-jacent et descend en avant de l'intestin pharyngien, sous forme d'un diverticule bilobé. Au cours de cette migration, la glande reste en connexion avec le plancher de l'intestin pharyngien par l'intermédiaire d'un canal étroit, le canal thyroglosse.

L'activité fonctionnelle de la thyroïde débute vers la fin du troisième mois, date à laquelle deviennent visibles les premiers follicules remplis de colloïde. Les cellules folliculaires sécrètent la substance colloïde dans laquelle se trouve la *thyroglobuline*. Celle-ci est absorbée par les cellules folliculaires et hydrolysée en *thyroxine* (T4) et *tri-iodothyronine* (T3). Les cellules parafolliculaires ou cellules C, dérivées du corps ultimo-branchial, sécrètent la *calcitonine*.

### B. Le thymus

L'endoderme de la 3<sup>e</sup> poche branchiale présente à son extrémité distale deux récessus ventral et dorsal. A la 5<sup>e</sup> semaine, l'épithélium du récessus dorsal de la 3<sup>e</sup> poche se différencie en tissu parathyroïdien, tandis que le récessus ventral forme l'ébauche du thymus.

Le rudiment thymique migre en direction caudale et médiale, entraînant avec lui la parathyroïde inférieure. Il rejoint rapidement sa situation définitive dans le thorax, où il fusionne avec son homologue du côté opposé. Peu de temps après, le rudiment thymique reçoit une capsule de mésenchyme dérivé de la crête neurale. Celle-ci envoie des septums de tissu conjonctif à l'intérieur des cordons épithéliaux endodermiques. En l'absence de ces dérivés de la crête neurale, le thymus interrompt son développement. Une interaction entre la crête neurale et les composants endodermiques du thymus apparaît donc indispensable pour assurer la différenciation et le fonctionnement correct du thymus. Les vecteurs moléculaires de cette interaction sont toutefois non identifiés. On admet aujourd'hui que le syndrome congénital de DiGeorge (aplasies thymique et parathyroïde, anomalies des gros vaisseaux de la base) pourrait provenir d'une absence de migration des cellules de la crête neurale céphalique.

Les cellules épithéliales issues du bourgeonnement de l'entoblaste des poches viscérales s'organisent en un réseau dont les mailles sont colonisées par des cellules souches hématopoïétiques, précurseurs des lymphocytes T (thymocytes ou lymphocytes

thymo-dépendants). Cette colonisation a lieu vers la 8<sup>e</sup> – 9<sup>e</sup> semaine chez l'homme. L'origine de ces thymocytes est encore controversée. Chez la caille, elles proviennent de l'hémangioblastème du sac vitellin, puis du foie fœtal, et enfin de la moelle osseuse. La migration discontinue des thymocytes vers l'ébauche thymique suggère l'existence d'un processus d'attraction périodique par l'épithélium thymique qui produirait un ou plusieurs facteurs chimiotactiques de nature encore inconnue.

#### *C. Les amygdales palatines*

Elles proviennent d'une prolifération de l'épithélium dorsal de la 2<sup>e</sup> poche pharyngée qui s'infiltré progressivement de lymphocytes comme le thymus.

#### *D. Les parathyroïdes*

Au nombre de deux paires, elles proviennent de l'épithélium dorsal des 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> poches pharyngées. Elles sécrètent la *parathormone*, hypercalcémiant. Cette origine pharyngienne est toutefois contestée chez l'homme et le poulet où les parathyroïdes pourraient avoir une origine épiblastique à partir de placodes épibranchiales.

#### *E. Les corps ultimo-branchiaux*

Absents chez les Agnathes, ils proviennent de l'épithélium de la dernière poche pharyngée. Celui-ci est secondairement colonisé par des cellules migratrices issues des crêtes neurales qui s'y différencient en cellules endocrines sécrétrices de calcitonine, une hormone hypocalcémiant.

Chez les Mammifères, les corps ultimo-branchiaux sont incorporés dans la glande thyroïde et leurs cellules correspondent aux cellules parafolliculaires ou cellules C.

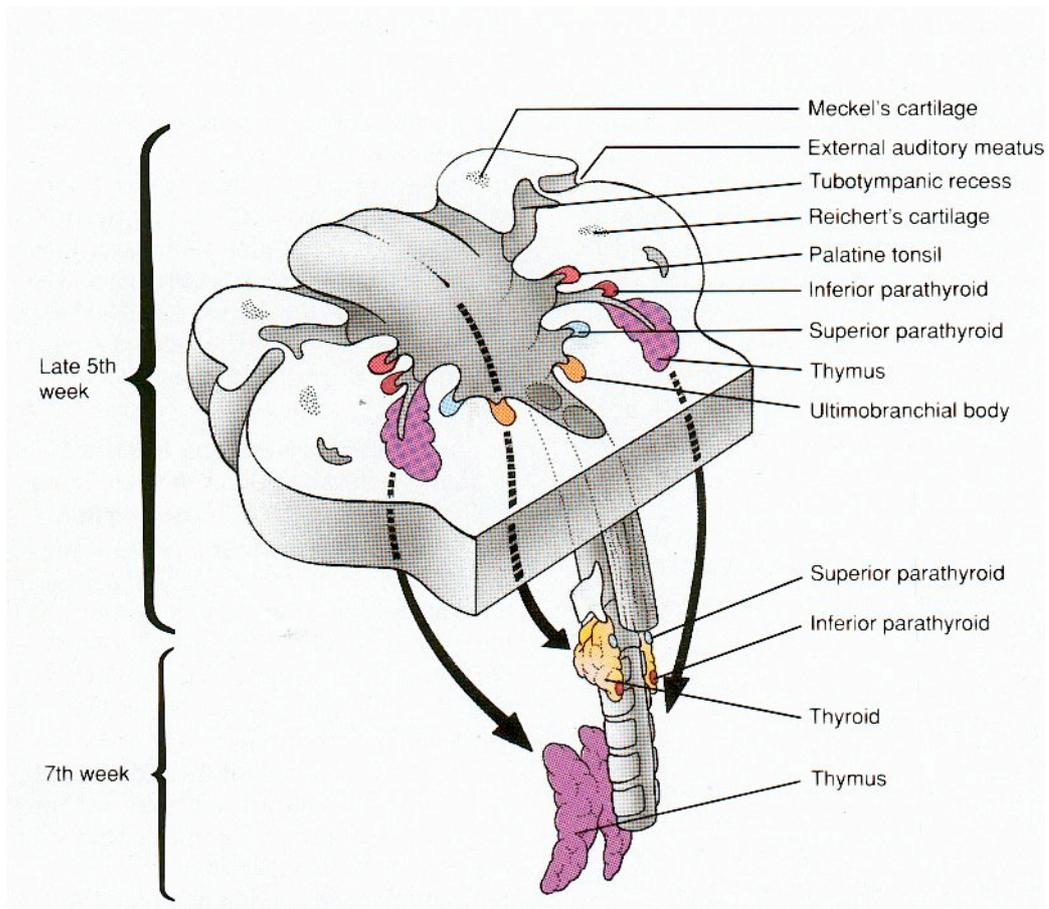


Fig. VIII.15 - *Migration du thymus, des glandes parathyroïdes et du corps ultimo-branchial.*

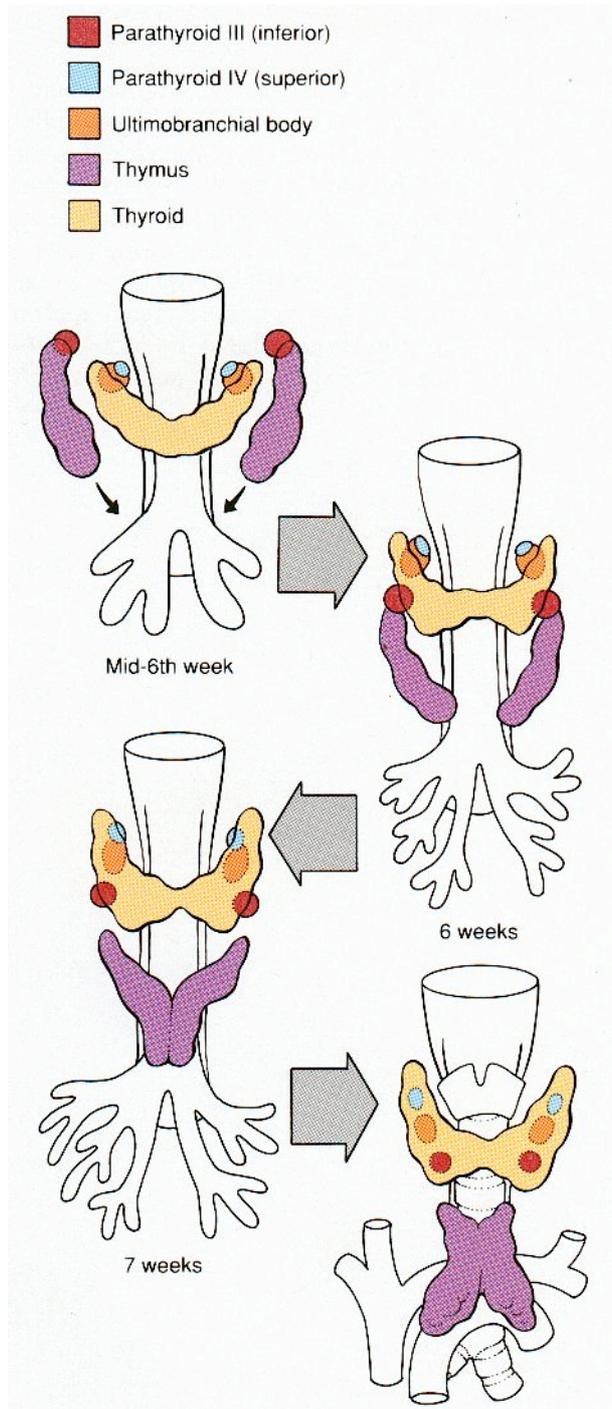


Fig. VIII.16 - Relations entre thyroïde, thymus et parathyroïdes.

## ***IX. Un modèle de différenciation cellulaire : différenciation des lymphocytes T dans le thymus et tolérance centrale au soi***

Le rôle essentiel du système immunitaire est d'assurer la protection de l'organisme-hôte vis-à-vis des agents infectieux extérieurs (le non soi). En raison de la nature chimique commune des antigènes extérieurs et des antigènes du soi, le système immunitaire avant même de remplir son rôle doit être éduqué à reconnaître la structure moléculaire du soi. Ce phénomène fondamental de la vie porte le nom de *tolérance au soi*.

Le concept de tolérance immunitaire est resté longtemps un problème purement théorique à l'usage des fondamentalistes. Or, la confrontation est de plus en plus fréquente avec les conséquences cliniques d'une rupture de la tolérance immunitaire, soit spontanée comme dans les maladies auto-immunes, soit provoquée comme dans le rejet d'organes transplantés. Le manque de thérapeutique spécifique et dénuée d'effets secondaires est certainement une des causes du développement des recherches dans ce domaine au cours des dernières années. La tolérance a quitté alors les chemins ardu de l'immunologie théorique pour descendre dans l'arène de l'expérimentation. Le *thymus* joue un rôle essentiel dans la tolérance immunitaire dite *centrale*, en particulier pendant le développement embryonnaire. Des mécanismes extra-thymiques interviennent dans l'induction de la tolérance immunitaire dite *périphérique*.

La propriété fondamentale du système immunitaire, celle de reconnaître spécifiquement un univers d'antigènes infectieux du non soi, cette génération de la diversité, provient de l'action de deux enzymes (recombinases) encodées par deux gènes différents, *RAG1* et *RAG2*. Ces deux enzymes catalysent de manière aléatoire la recombinaison des segments de gènes encodant les parties variables des immunoglobulines (B-cell receptor for the antigen, BCR) et du récepteur à l'antigène des cellules T (TCR). Il en résulte une multitude de combinaisons différentes capables de lier soit des épitopes conformationnels de molécules pour les BCR, soit des séquences dérivées de molécules plus grosses qui sont alors présentées par les protéines dérivées du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) en ce qui concerne les TCR.

Le thymus se compose de deux lobes divisés chacun en une multitude de lobules par des septums de tissu conjonctif émanant de la capsule externe. Nous avons vu plus haut le développement du parenchyme thymique. Le composant essentiel de ce dernier ( $\pm 90\%$ ) est formé de *cellules épithéliales* dérivées de l'endoderme de la 3<sup>e</sup> poche pharyngée. La crête neurale céphalique joue un rôle inducteur essentiel pour le développement du mésenchyme thymique et, secondairement, sur la croissance définitive de l'épithélium thymique primitif. Ce rôle inducteur important de la crête neurale céphalique sur le développement de l'ébauche épithéliale thymique a été mis en évidence par des expériences d'ablation de cette partie de la crête neurale. A la jonction cortico-médullaire des lobules thymiques, on trouve des *cellules dendritiques*, qui sont des cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes (CPA); enfin, des *macrophages* tissulaires sont disséminés au sein du parenchyme thymique. Ces deux dernières populations cellulaires proviennent de la moelle osseuse.

### Les populations cellulaires du thymus

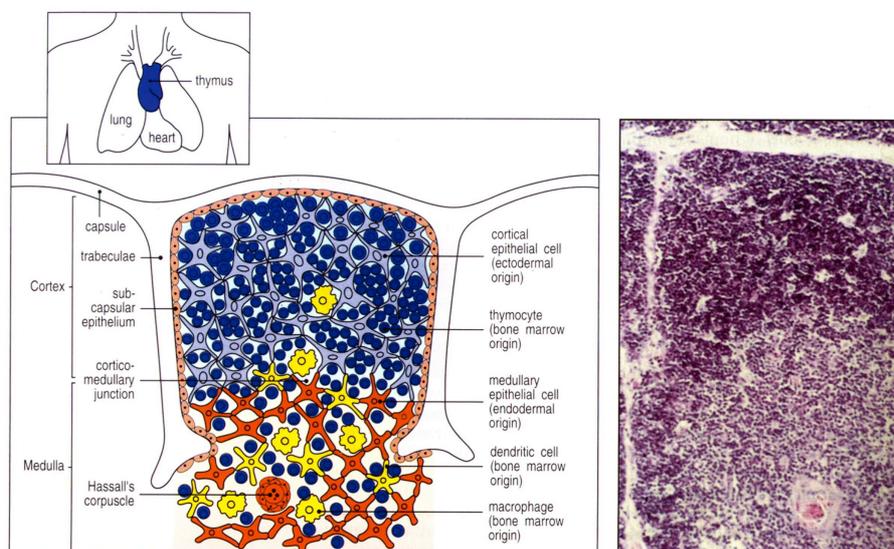


Fig. IX.1 - *Populations cellulaires du thymus.*

La différenciation des lymphocytes T se déroule essentiellement dans le thymus. C'est d'ailleurs pour cette raison que ces cellules ont reçu le qualificatif de lymphocytes T (thymo-dépendants). Dans l'espèce humaine, la différenciation intra-thymique a lieu surtout pendant la vie fœtale. Ce processus se caractérise d'abord par un phénomène purement aléatoire, la recombinaison au hasard des segments de gènes codant pour les parties variables des TCR. Ce processus stochastique est néanmoins contrôlé par l'environnement thymique. Le rôle physiologique du thymus est donc double. Non seulement cet organe contrôle la maturation de l'ensemble du répertoire des lymphocytes T périphériques (*sélection positive* des cellules T), mais il est aussi responsable de la mort et/ou de l'arrêt du développement (*sélection négative*) des cellules T qui expriment un TCR orienté vers un composant moléculaire du soi (cellules T self-réactives). Le thymus est donc avant tout un cimetière, un filtre puissant, car sur un total de 100 cellules T précurseurs, environ 2-5% seulement vont quitter le thymus pour gagner la périphérie, dans un état de compétence vis-à-vis du non soi et de tolérance vis-à-vis du soi. Ce double rôle du thymus dans la sélection négative (mort) et la sélection positive (vie) des cellules T demeure un paradoxe important en immunologie contemporaine, difficilement expliqué par les modèles cellulaires et moléculaires proposés.

### *Environnement du thymus et différenciation T*

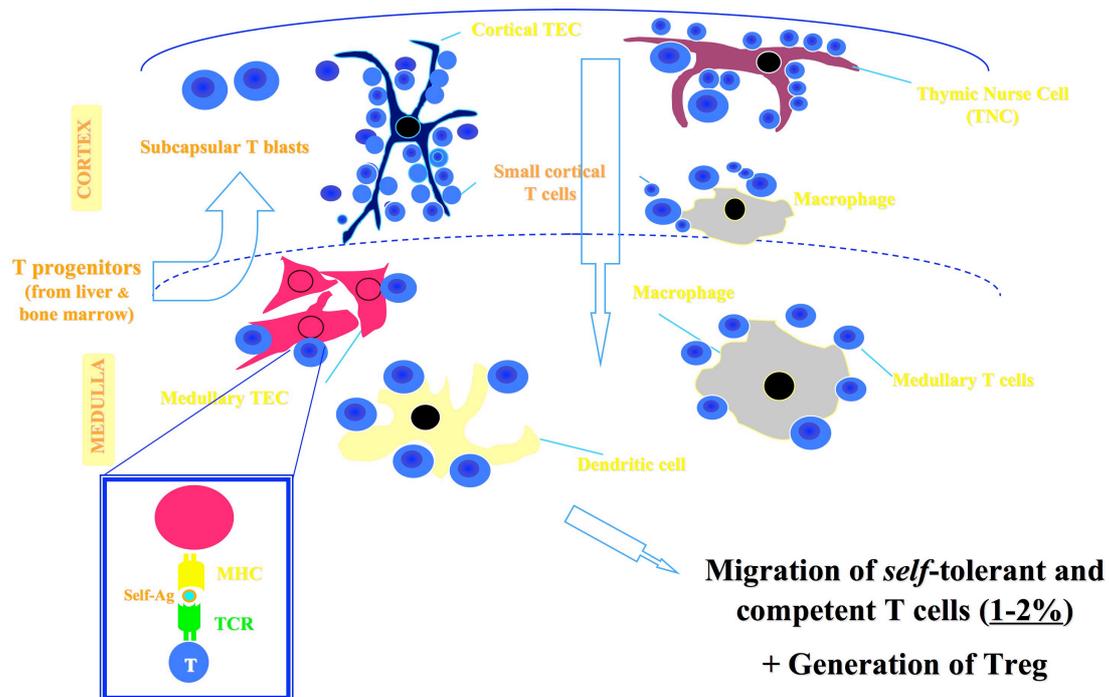


Fig. IX.2 - Parcours intra-thymique des précurseurs des lymphocytes T.

La réponse à cette question est néanmoins fondamentale car un défaut dans l'éducation des cellules T pour un composant moléculaire particulier aboutit à la maturation intra-thymique continue de cellules T non tolérantes pour ce composant moléculaire. Dans les années soixante déjà, Sir Frank Macfarlane Burnet avait émis l'hypothèse que le thymus jouait un rôle homéostatique majeur dans l'équilibre fonctionnel immunitaire. Selon cet auteur, des maladies auto-immunes pouvaient se déclarer suite à une perturbation de ce mécanisme physiologique qui permettrait l'apparition à la périphérie de clones « interdits » de lymphocytes T, c'est-à-dire de lymphocytes non tolérants, pouvant interagir avec un composant interne de l'organisme et déclencher une maladie auto-immune spécifique d'organe.

L'épithélium thymique (dont les cellules « nourrices » hébergées dans le cortex externe) est le siège de la synthèse de polypeptides apparentés aux grandes familles neuroendocrines (comme la famille de l'insuline, la famille neurohypophysaire et celle des tachykinines). Le niveau de transcription thymique des gènes correspondant est en partie contrôlé par le gène *AIRE* (AutoImmune REgulator gene) qui semble coder pour un facteur de transcription. Les études réalisées dans notre laboratoire ont montré que les polypeptides thymiques s'engagent dans deux types d'interactions distincts avec les cellules T intra-thymiques (thymocytes). D'une part, ils sont la source de *signaux* intervenant dans la différenciation des cellules T selon le mode de la communication cryptocrine en se liant à un récepteur de type endocrine exprimé à la surface des thymocytes. D'autre part, ces mêmes précurseurs sont la source d'antigènes du soi (*self-antigènes*) capables de représenter leur famille respective face à une composante cellulaire majeure encore immature du système immunitaire. La présentation de ces antigènes du soi aux thymocytes exprimant un TCR qui leur est spécifique induira la délétion par apoptose ou l'arrêt du développement de ces thymocytes réactifs vis-à-vis du soi.

## Le double rôle des précurseurs thymiques neuroendocrines

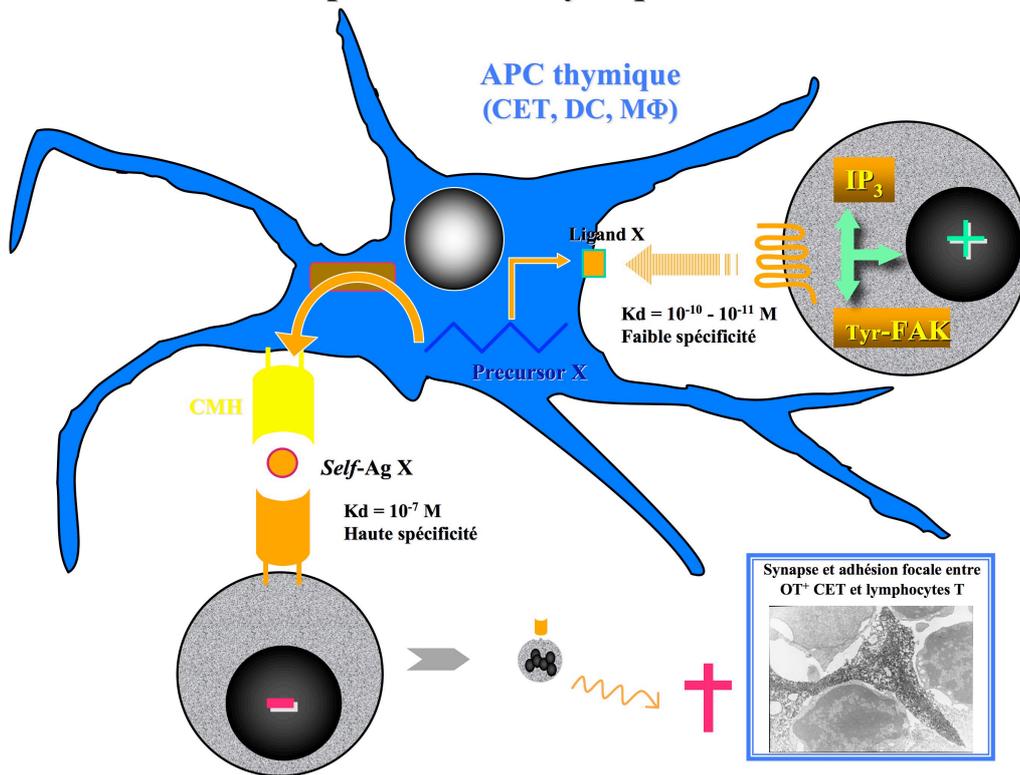


Fig. IX.3 - Schéma du double rôle des précurseurs thymiques apparentés aux familles neuroendocrines.

Selon ce modèle, la sélection positive des cellules T ( $T^+$ ) résulte de la réception et de l'intégration par les lymphocytes-cibles des différents ligands X synthétisés dans le microenvironnement thymique.

La sélection négative ( $T^-$ ) serait secondaire à la présentation par les protéines thymiques du CMH des séquences (self-Ag X) caractéristiques de la famille à laquelle ces précurseurs appartiennent. Ces séquences self-antigéniques sont très conservées au cours de l'évolution des familles neuroendocrines et correspondent aux épitopes qualifiés d'immunodominants par certains auteurs.

La microphotographie montre un prolongement de cellule épithéliale thymique marquée au moyen d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'ocytocine (OT). Ce cliché nous a été fourni par le Dr. M. Wiemann (Université de Münster, Allemagne).

Le répertoire thymique des polypeptides apparentés aux familles neuroendocrines transpose donc à l'échelon moléculaire le double rôle physiologique du thymus dans la différenciation des lymphocytes T. Un principe « économique » régit l'organisation du répertoire thymique des précurseurs neuroendocrines. En effet, l'épithélium thymique n'exprime pas tous les membres d'une famille, mais il existe un membre dominant exprimé dans le thymus, qui est porteur d'épitopes représentatifs de cette famille. De manière générale, les self-antigènes neuroendocrines correspondent aux séquences peptidiques les plus conservées au cours de l'évolution d'une famille donnée. Nos travaux les plus récents confirment que l'éducation au soi des lymphocytes T utilise la voie des protéines dérivées du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Toutefois, la présentation de l'ocytocine et de la neurotensine ne semble pas soumise à une restriction par les allèles du CMH comme c'est le cas pour la présentation des antigènes en périphérie. Pour simplifier, s'il était parfaitement concevable que l'éducation au soi des lymphocytes T ne soit pas un problème de type individuel, nos études apportent un argument expérimental en faveur de ce raisonnement. Enfin, l'étude de l'apprêtement et de la présentation de l'ocytocine thymique en tant que self-antigène de la famille neurohypophysaire a permis d'illustrer le continuum évolutif remarquable entre deux grandes familles de protéines impliquées dans la reconnaissance moléculaire, ainsi que la forte probabilité d'une origine ancestrale commune.

La tolérance T vis-à-vis des fonctions neuroendocrines implique donc la présentation intra-thymique des self-antigènes caractéristiques et les mieux conservés des familles de protéines neuroendocrines. De plus en plus d'arguments expérimentaux s'accumulent en faveur de l'idée qu'un défaut dans cette éducation thymique jouerait un rôle central dans la pathogénie de certaines maladies auto-immunes, en particulier le diabète de type 1 (insulino-dépendant). La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de la tolérance immunitaire centrale devrait permettre de reprogrammer celle-ci en cas de rupture spontanée comme dans les maladies auto-immunes. Cette approche préventive serait basée sur la mort induite des cellules T self-réactives par un nouveau type de vaccination, la self-vaccination « négative » ou « tolérogène ». Il n'est plus illusoire aujourd'hui d'envisager que l'espèce humaine puisse s'acquitter bientôt des pathologies auto-immunes qui la frappent et qui représentent un peu le lourd tribut qu'elle doit payer en échange de la diversité et de la complexité de son système de défenses immunitaires.

Au cours des chapitres précédents, nous avons examiné le détail du développement d'un organisme depuis la fécondation jusqu'à la mise en place du plan embryonnaire de base. Nous avons abordé ensuite l'étude des dérivés des trois feuillets principaux de l'embryon.

Sur la base du schéma général de l'évolution, tant ontogénique que phylogénique, de la communication cellulaire, nous avons vu que le thymus représente une étape cruciale au cours de la vie fœtale pour l'apprentissage du système immunitaire à reconnaître la structure du soi avant que ses composants cellulaires n'aillent exercer leurs fonctions de défense contre les agressions du non soi.

Dans les chapitres qui suivent, nous montrerons comment les données de l'embryologie peuvent être utiles pour la compréhension d'une pathologie majeure comme le cancer. Nous donnerons également un aperçu sur les avancées majeures en biotechnologie qui permettent aujourd'hui de déterminer avec précision l'activité d'un gène au cours du développement d'un individu. Enfin, ce cours se terminera par un chapitre sur un sujet important, celui des cellules souches et de leurs applications potentielles en médecine régénérative.

## *X. Développement normal et oncogenèse*

Une manière d'aborder l'origine du cancer est de le considérer comme résultant d'une panne des systèmes de contrôle du développement. Les cellules cancéreuses semblent échapper à tout contrôle de croissance et de multiplication. Dans de nombreux cas, cela va de pair avec une déficience des processus normaux de la différenciation cellulaire. Les cellules cancéreuses se caractérisent souvent par un aspect "dédifférencié" et nombre d'entre elles ont retrouvé le caractère pluripotentiel caractéristique de la période fœtale. De plus, l'aspect le plus malin des cellules cancéreuses résulte d'une perte de contrôle de la migration cellulaire, conduisant les cellules atteintes à se disperser dans de nombreuses régions de l'organisme, à partir du lieu où la tumeur s'est formée. Ces deux propriétés caractérisent la cellule cancéreuse: sa multiplication n'est plus soumise aux contrôles normaux, et elles colonisent d'autres tissus pour former ce que l'on appelle des métastases.

### **Le cycle cellulaire normal**

Un grand nombre de types cellulaires peuvent être mis en culture. Si l'on a pris soin de mettre un milieu d'incubation adéquat, contenant le facteur de croissance approprié au type cellulaire, les cellules se fixeront et continuent à croître et à proliférer. Dans un premier temps, les cellules grandissent, jusqu'à doubler leur contenu et leur taille, puis elles se divisent pour produire deux nouvelles cellules. L'ensemble de ce processus

dure normalement de 12 à 24 heures. La division elle-même s'effectue à peu près en une heure.

Le cycle mitotique de toute cellule est divisé en quatre phases (Fig. X1). L'*interphase* (*phase G1*) est la période pendant laquelle la cellule assume les fonctions caractéristiques de sa différenciation. La *phase S* est la préparation à la mitose et est caractérisée par une réplication de son matériel d'ADN. Cette synthèse d'ADN est suivie par une brève *phase G2*, qui précède la mitose proprement dite (*phase M*). Des travaux expérimentaux réalisés sur des œufs de grenouille ont suggéré depuis longtemps l'existence d'un facteur inducteur (*maturation-promoting factor, MPF*) de la méiose et de la mitose. Ce MPF est un complexe de deux protéines appelées *cycline* et *cdc2* (cell division cycle), qui guide la cellule à travers son cycle mitotique. La protéine *cdc2* est présente pendant tout le cycle mitotique. La cycline est synthétisée et s'accumule dans la cellule pendant l'interphase, puis elle se combine avec *cdc2* pour former le précurseur du complexe promoteur de la maturation (pré-MPF). Une modification enzymatique ultérieure transforme ce complexe en la forme active du MPF qui initialise la mitose. Celle-ci est précédée par la phosphorylation de nombreuses protéines suite à l'action du MPF. La rupture de la membrane nucléaire, par exemple, est due à la phosphorylation de *lamines nucléaires*, ou protéines d'enveloppe. La phosphorylation cause la dissociation des lamines, ce qui conduit à la désintégration de l'enveloppe nucléaire.

Le MPF actif induit aussi des enzymes qui vont détruire la protéine cycline. La baisse des taux de cycline entraîne la perte d'activité de *cdc2* et la mitose se termine. Il s'ensuit une baisse de l'activité MPF ce qui aboutit à la stimulation de phosphatases cellulaires qui hydrolysent les groupes phosphates qui avaient été ajoutés à certaines protéines cellulaires sous l'influence du MPF. La membrane nucléaire se remet en place, secondairement à la déphosphorylation des lamines nucléaires. Les phosphatases inactivent aussi les enzymes qui dénaturent la cycline, ce qui permet à celle-ci de s'accumuler à nouveau au sein de la cellule pendant l'interphase. Une nouvelle division cellulaire peut ainsi se dérouler.

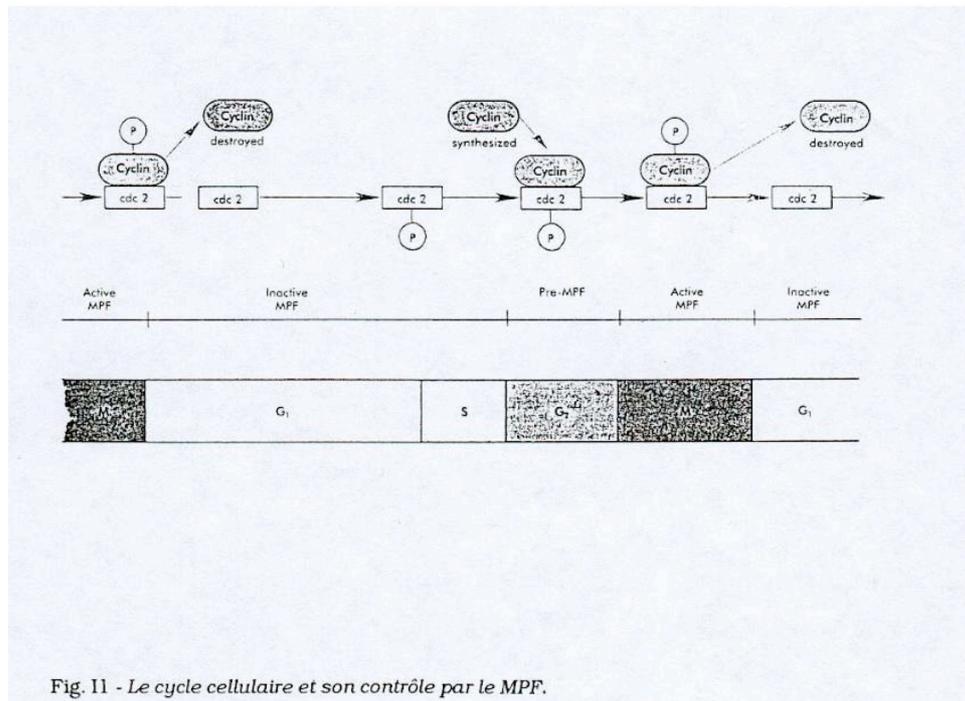


Fig. 11 - Le cycle cellulaire et son contrôle par le MPF.

Fig. X.1 - Le cycle cellulaire et son contrôle par le MPF.

Quand on met des cellules en culture, elles se multiplient jusqu'à ce que le fond de la boîte soit recouvert d'une couche unicellulaire ininterrompue (*confluence*). Les cellules arrêtent alors de se diviser et restent en état de quiescence. Si on en prélève quelques unes pour les étaler dans une autre boîte à une densité moindre, elles entreront à nouveau dans le cycle et continueront à se multiplier. Les cellules cancéreuses ne grandissent pas et ne se multiplient pas plus rapidement que des cellules normales mais, et c'est la différence fondamentale, elles continuent de croître dans des conditions où des cellules normales se seraient arrêtées. Ainsi, des cellules cancéreuses atteignent des densités beaucoup plus élevées que des cellules normales lorsqu'elles sont mises en culture. Fait plus important encore, les cellules cancéreuses ont besoin d'une quantité beaucoup moins grande de facteurs de croissance. Elles sont tellement modifiées qu'elles se comportent comme si des facteurs de croissance étaient présents, même s'il n'y en a pas dans le milieu. Cette situation pourrait être due au fait que ces cellules produisent leurs propres facteurs de croissance. Elles s'autostimuleraient donc en

permanence (selon le mode *autocrine* décrit précédemment). Une autre possibilité serait que les récepteurs des facteurs de croissance, ou une partie du processus de transduction entre le récepteur membranaire et l'intérieur de la cellule, soient altérés de telle sorte que le système est continuellement activé. Les cellules se comporteraient là aussi comme si les facteurs de croissance étaient présents.

### **Les causes**

Comme l'embryon, les tumeurs semblent posséder un programme de développement spécifique. Contrairement au développement embryonnaire toutefois, ces programmes anormaux sont très variables. Les tumeurs débutent par un dysfonctionnement dans le comportement de la cellule qui va conduire progressivement à un véritable cancer. Il existe en général une longue période entre l'exposition à un agent carcinogène (comme les irradiations) et le développement d'une maladie cancéreuse cliniquement décelable. Cette longue période est en partie due au fait que les cellules doivent subir un certain nombre de modifications avant de devenir vraiment cancéreuses et malignes.

La transformation cancéreuse ne se fait pas en une fois, mais en *plusieurs étapes* successives. L'un de ces stades de développement du cancer semble être l'acquisition de l'immortalité, c'est-à-dire la capacité de se multiplier indéfiniment, à la différence des cellules normales. D'autres étapes permettent aux cellules d'échapper aux contrôles normaux de la prolifération et de la différenciation puis de se déplacer et de coloniser d'autres tissus. Chacune de ces étapes nécessite probablement une modification spécifique de la constitution génétique de la cellule, c'est-à-dire une mutation. On peut ainsi considérer que l'apparition d'un cancer correspond à une succession de "coups" portés à l'ADN de la cellule, qui la fait se rapprocher peu à peu de l'état malin. Etant donné que chaque "coup" est un événement rare, la probabilité qu'une cellule en subisse la totalité par hasard est très faible. Cependant, avec le temps, le risque qu'une même cellule soit touchée augmente. C'est vraisemblablement pour cette raison que le cancer est essentiellement une maladie de l'âge adulte. Il existe malgré tout des cancers qui affectent les enfants. Ceux-là sont liés à des défauts génétiques, qui font que le nombre d'étapes conduisant à la formation d'un cancer est moins élevé.

L'*origine clonale* des tumeurs est aussi un argument en faveur de l'idée que le cancer provient d'un processus anormal de développement. Le cancer peut aussi

résulter d'un développement normal qui a été perturbé par une modification de l'environnement cellulaire. La perte de l'environnement normal de cellules embryonnaires lors de leur mise en culture peut ainsi favoriser leur transformation en cellules pluripotentiellles pouvant se diviser indéfiniment. Cette modification est néanmoins réversible et, lorsque ces cellules sont remises à leur place adéquate dans l'embryon, elles reprendront un développement normal.

Un mécanisme semblable à ceux qui sont intervenus au cours de l'évolution joue un rôle essentiel dans le développement d'une tumeur. Quand des cellules normales, comme celles du foie, se multiplient, les cellules filles sont identiques à la cellule mère. Les cellules cancéreuses sont beaucoup moins stables et les cellules filles sont différentes. Cette variabilité des cellules cancéreuses conduit malheureusement à la sélection, au sein de la tumeur, des cellules qui se multiplient le plus rapidement et qui résistent le mieux aux défenses, notamment immunitaires, de l'organisme. Le fait que les cellules cancéreuses finissent par tuer l'hôte dans lequel elles se développent n'y change rien. Plus une cellule potentiellement maligne se multiplie, plus elle a de chances de voir apparaître dans sa descendance une cellule capable de franchir une étape supplémentaire vers la tumorigénèse.

Chez des cellules normales, celles qui se divisent risquent beaucoup plus de devenir cancéreuses. Les cancers qui sont de loin les plus nombreux sont les *carcinomes*, c'est à dire des cancers qui dérivent de cellules responsables de la régénération de la peau ou de la paroi des tractus digestif et uro-génital. Les *leucémies* se développent aussi à partir de cellules sanguines qui sont constamment en division et en différenciation. Un blocage de la voie normale de maturation semble être survenu pour une raison inconnue, et les cellules continuent à se diviser sans aucune restriction. Si l'on pouvait trouver des substances qui obligent les cellules à accomplir totalement leur différenciation, on pourrait arrêter leur multiplication anormale.

### **Tumeurs et vaisseaux sanguins**

Les tumeurs attirent les vaisseaux sanguins pour assurer leur développement. Si la circulation sanguine n'apporte pas l'oxygène et les nutriments nécessaires à la tumeur, celle-ci demeure discrète et finit par disparaître. Les tumeurs libèrent des *facteurs angiogènes*, qui vont favoriser la formation de néo-vaisseaux à leur voisinage. Lorsque

les connexions sont établies, la croissance tumorale devient dramatique. La formation locale de vaisseaux sanguins peut donc avoir des conséquences fatales et son inhibition pourrait constituer une nouvelle approche dans la thérapie anti-cancéreuse.

### **Gènes et cancer**

Des gènes normaux appelés *proto-oncogènes* participent au contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Souvent, ces gènes codent pour une protéine intervenant comme un maillon important de la communication cellulaire, soit au niveau du message (signal), de sa réception ou de sa transduction vers le compartiment intracellulaire. Une modification de l'activité de ces oncogènes peut donc conduire à la perte du contrôle de la prolifération ou de la différenciation. Certains oncogènes codent par exemple pour des facteurs de croissance. Lorsqu'il est dans un état anormal, le gène est continuellement exprimé de telle sorte que la cellule produit un facteur qui va stimuler en permanence sa propre multiplication. D'autres oncogènes spécifient des protéines qui sont impliquées à un autre niveau du contrôle: l'altération du gène aboutit également à une multiplication constante et incontrôlée de la cellule. De plus, il existe des gènes qui régulent l'activité des oncogènes. Des mutations peuvent là aussi provoquer l'apparition d'un cancer. De nouveau, ce sera parce que la machinerie de la multiplication fonctionnera en permanence et que le parcours normal de la différenciation aura été interrompu.

## *XI. Les cellules souches*

La médiatisation excessive du terme de « *clonage* » a embrouillé le débat sur l'utilisation thérapeutique potentielle des cellules souches embryonnaires. Une mise au point est plus que jamais nécessaire.

➤ D'abord qu'est-ce qu'un « *embryon* » ? Comme nous l'avons vu en détail dans ce cours, un embryon est le résultat de la mise en commun de la moitié des chromosomes paternel et maternel contenus dans les noyaux des gamètes sexuels. Chez l'Homme, seule cette entité doit être au centre du débat sur la personnalité de l'embryon humain, y compris sur son statut juridique éventuel.

➤ Le « *clonage reproductif* » d'espèces animales (comme la grenouille) par transfert nucléaire était connu avant le clonage surmédiatisé de la brebis Dolly par l'équipe du professeur Ian Wilmut (Ecosse). Le clonage reproductif repose sur une technique qui consiste à transplanter le noyau (*transfert nucléaire*) d'une cellule somatique adulte dans un ovule (cellule germinale) préalablement débarrassé de son propre noyau. Dans un certain nombre de cas très limité, le noyau d'une cellule adulte peut être « *reprogrammé* » pour contrôler la formation d'un nouvel individu comme en est capable le noyau d'un embryon résultant de la fusion des gamètes sexuels.

➤ Le clonage reproductif du singe s'est révélé impossible à ce jour, et le transfert de noyau de primate dans des ovules de singes femelles ont conduit à des anomalies chromosomiques importantes. De plus, les rares animaux issus d'un clonage reproductif ont développé diverses anomalies comme un vieillissement accéléré, le développement de maladies dégénératives... Ces observations illustrent l'existence de frontières naturelles aujourd'hui infranchissables et soulignent l'importance de facteurs dits « *épigénétiques* » dans la programmation adéquate des noyaux présents dans les gamètes sexuels.

➤ Pour ces différentes raisons, le recours au clonage reproductif dans l'espèce humaine est donc interdit par l'ensemble du monde scientifique et par toutes les institutions mondiales. Face aux intentions criminelles de certains individus ou de certaines sectes, force est toutefois de constater que le bannissement de cet acte de pseudoscience n'est peut-être pas encore proclamé avec assez de vigueur à l'échelle internationale.

➤ Le « *clonage thérapeutique* » propose de greffer le noyau d'une cellule adulte d'une personne malade dans l'ovule donné par et prélevé chez une femme normale. Ce transfert nucléaire pourrait aboutir à la formation d'un « *blastocyste* » qui est constitué, comme l'embryon au même stade de développement précoce, d'une masse cellulaire interne (qui formera tous les tissus du fœtus et qui est la source des « *cellules souches totipotentielles* ») et d'une couche unicellulaire externe, le « *trophoblaste* » (dont dérivera le futur placenta). Le conditionnel est ici de mise car cette expérience n'a encore jamais réussi et l'article scientifique coréen ayant décrit ce succès s'est révélé être frauduleux. Contrairement au clonage reproductif, ce blastocyste ne sera jamais implanté dans l'utérus en vue d'une future grossesse. Seules, les cellules souches totipotentielles seront isolées et cultivées pour obtenir une différenciation en cellule nerveuse, cellule de muscle cardiaque, cellule sécrétrice d'insuline, etc. Dans le clonage thérapeutique, il n'existe donc pas de « création d'embryon » au sens propre du terme.

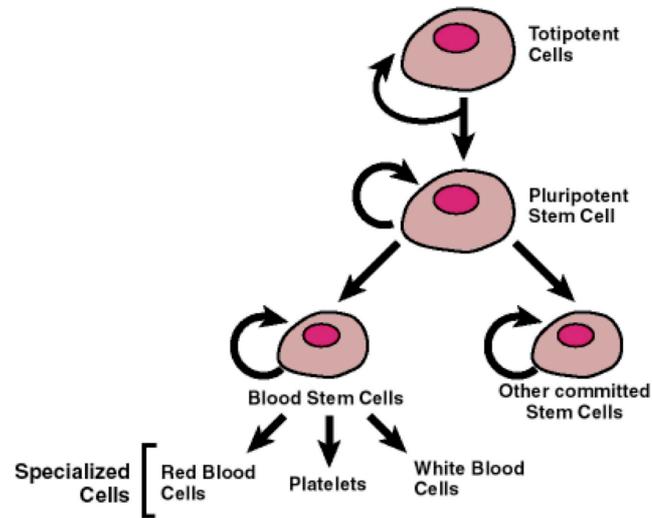
➤ Le bénéfice attendu de la greffe de cellules souches embryonnaires programmées, différenciées pour générer un tissu donné est l'absence de rejet, la parfaite « *tolérance* » de cette greffe par le système immunitaire du receveur. En effet, les cellules souches embryonnaires posséderont dans ce cas la même identité génétique que celle du patient dont est issu le noyau de départ. Ce bénéfice est absent si l'on greffe des cellules souches embryonnaires provenant d'embryons surnuméraires issus de la fécondation *in vitro*.

➤ Les résultats thérapeutiques positifs de la greffe de cellules souches embryonnaires dans des modèles animaux de maladies humaines sont encore trop fragmentaires pour envisager l'usage généralisé de cette thérapie cellulaire chez le patient. Quelques résultats prometteurs ont néanmoins été obtenus dans l'infarctus du myocarde et dans la maladie de Parkinson. De plus, dans la majorité des cas, nous ne connaissons pas toutes les voies de différenciation d'une cellule souche embryonnaire vers une cellule adulte spécifique.

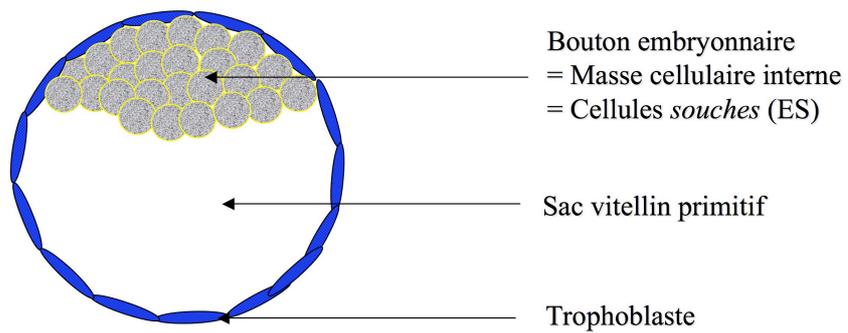
➤ Il convient de souligner aussi que l'individu héberge de nombreuses cellules souches *adultes* dont l'utilisation devrait permettre de mieux évaluer la réalité des espoirs placés dans le concept de cette nouvelle médecine régénératrice.

➤ Enfin, une équipe américaine et une équipe japonaise sont parvenues à reprogrammer des fibroblastes de la peau en cellules souches totipotentielles en transfectant ces fibroblastes avec des rétrovirus (ou des lentivirus) renfermant 4 gènes caractéristiques des cellules souches embryonnaires.

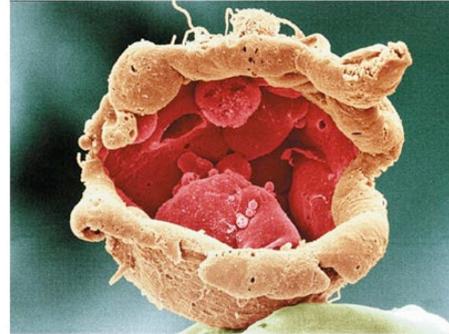
## Les différents types de cellules souches



## Le blastocyste

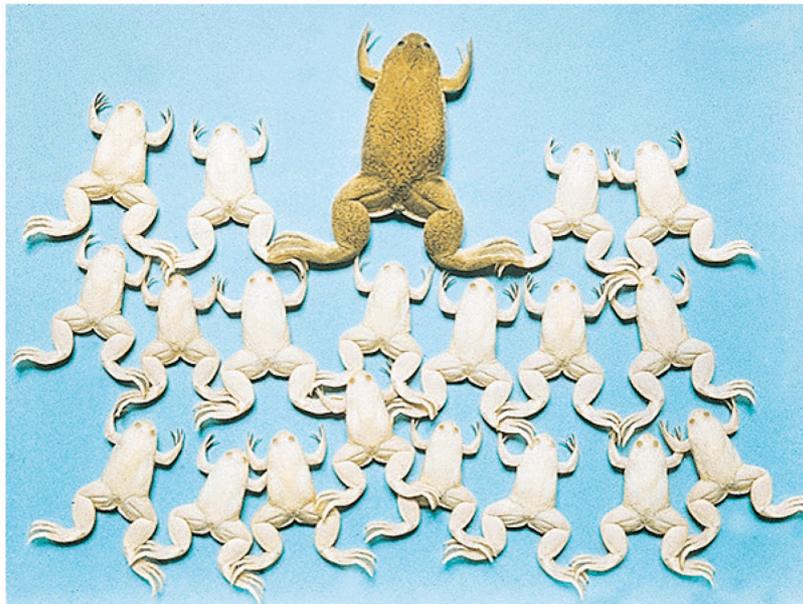


## *Les cellules souches embryonnaires (ES)*

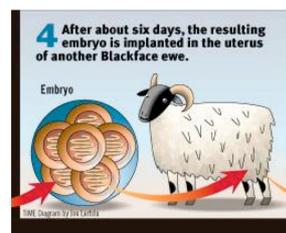
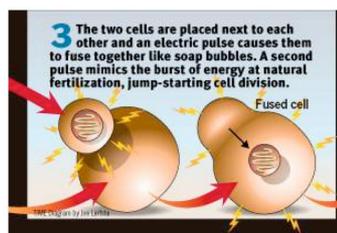
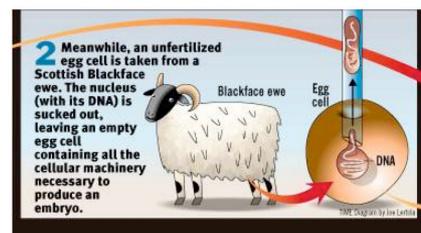
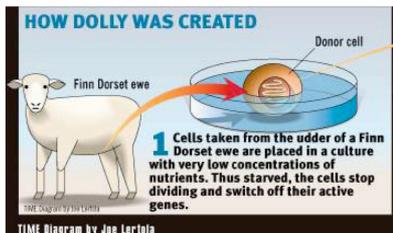
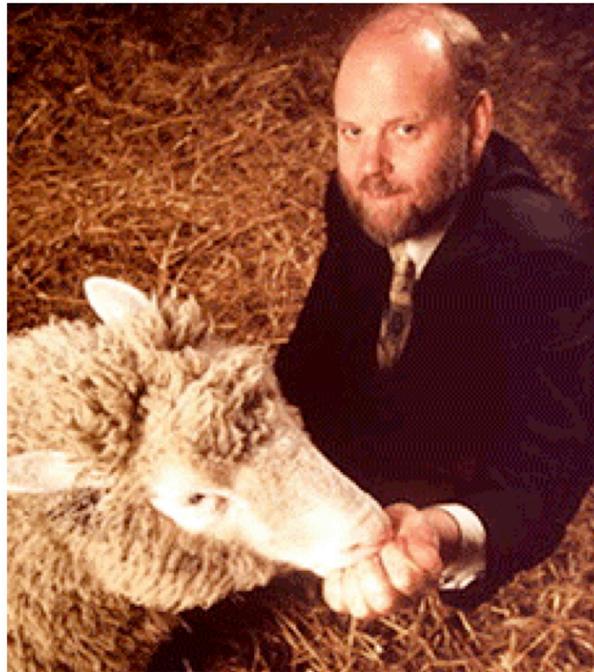


« Cellules de l'espoir » en médecine régénérative

## *Clonage d'amphibien (1957)*



# Le professeur Ian Wilmut et Dolly (1996)



## Somatic Cell Nuclear Transfer Data (August 2001)

Species	No Oocytes	Embryo transfer	Live Offspring	Died	Survived
Mice (7)	17,491	6842	159 <small>(+ 7 stillborn)</small>	29 18%	130
Cow (13)	8,919	742	71	26 37%	45
Sheep (3)	956	136	11 <small>(+3 stillborn)</small>	3 27%	8
Goat (3)	785+	427	16	6 38%	10
Pig (3)	2,856	1244	10	0	10

### *Importance des facteurs épigénétiques*

La gamétogenèse dure des semaines (formation des spermatozoïdes) ou des années (formation des ovules).

Dans le cas du transfert nucléaire, la reprogrammation épigénétique du noyau somatique dure de quelques minutes à quelques heures au maximum.

- ⇒ **Dérégulation imprévisible de l'expression des gènes précoces du développement.**

## *Les raisons d'interdire le clonage reproductif humain*

- Ce n'est pas une nécessité pour combattre la stérilité.
- Aucun progrès scientifique, aucune nouvelle connaissance ne peuvent être attendus de cette technique.
- Risque MAJEUR.
- Prédétermination de l'enfant « cloné ».
- Disparition de l'altérité, prédominance de l'identité de soi.

*« Le clonage reproductif est un acte d'arrogance sans aucune nécessité médicale »*

René FRYDMAN, *Le Nouvel Observateur*, 19 décembre 2002

*« Le clonage humain est tout simplement criminel »*

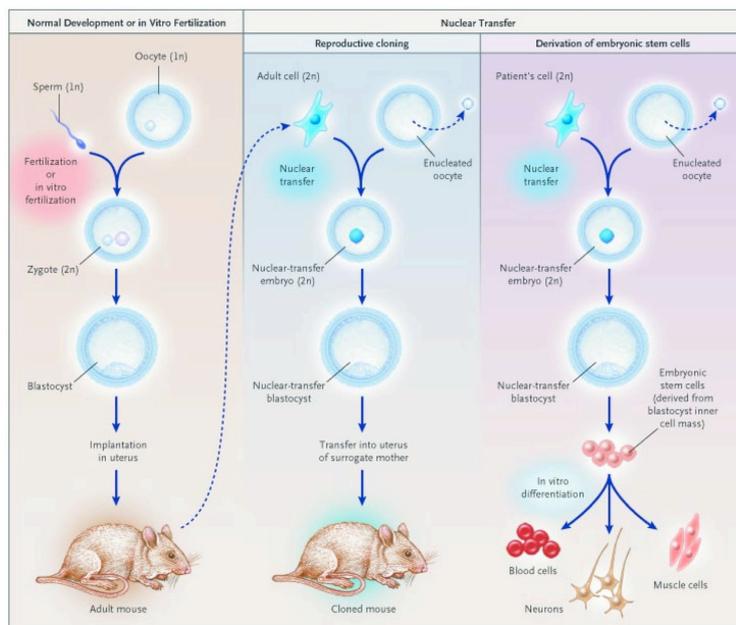
Norman ZINDER, Université Rockefeller, NY

# Le « Clonage » Thérapeutique :

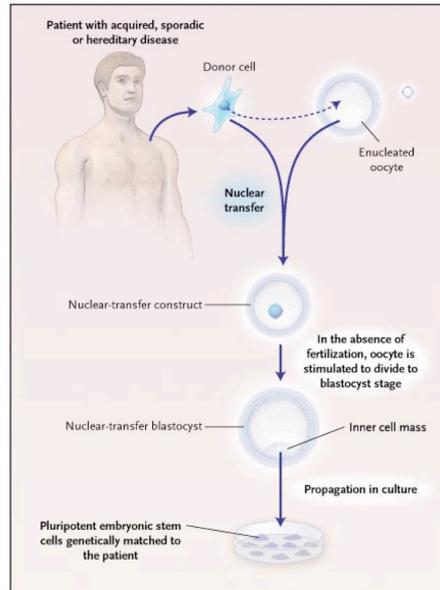
## Les cellules souches

### de l'espoir (*Stem cell therapy*)

*De la fertilisation in vitro au transfert nucléaire*

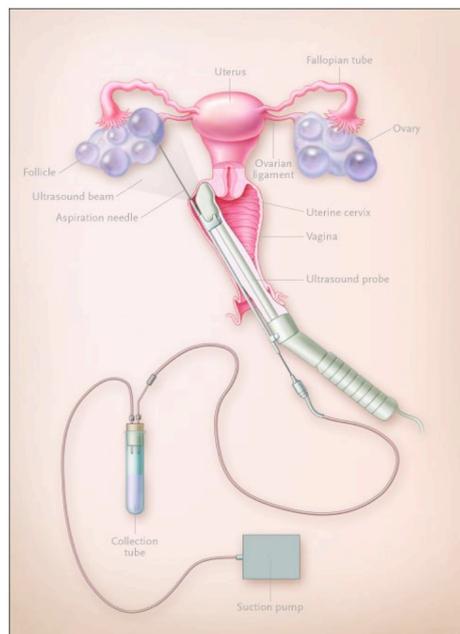


## Transfert nucléaire

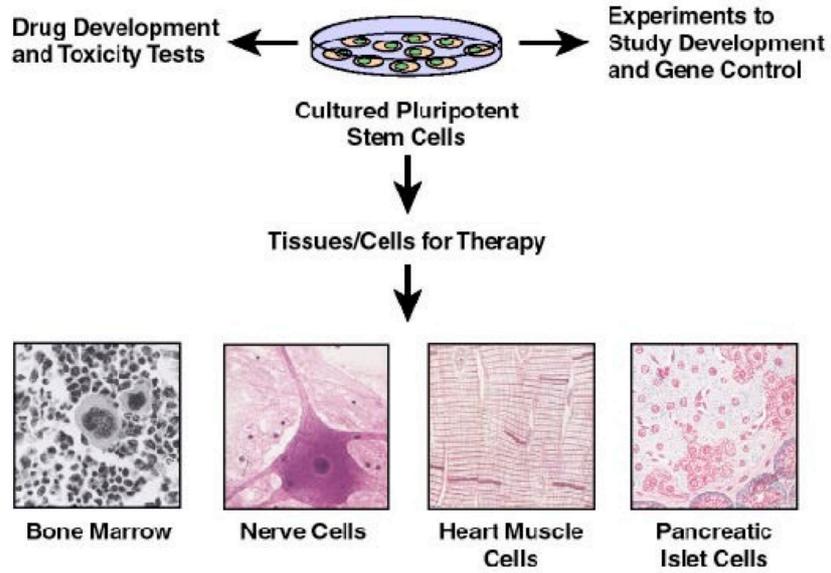


Bénéfice principal : absence de REJET par le système immunitaire (Tolérance)  
Bénéfice ABSENT en cas d'utilisation d'embryons surnuméraires

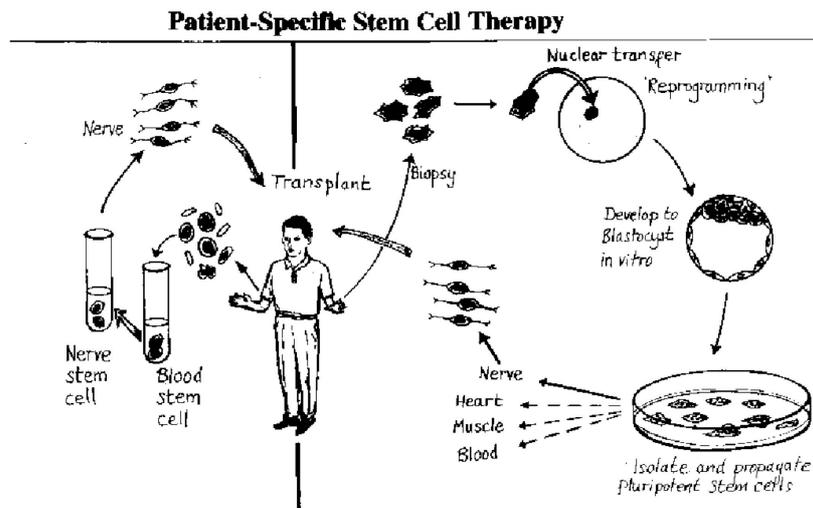
## Don d'ovules/ovocytes



## The Promise of Stem Cell Research

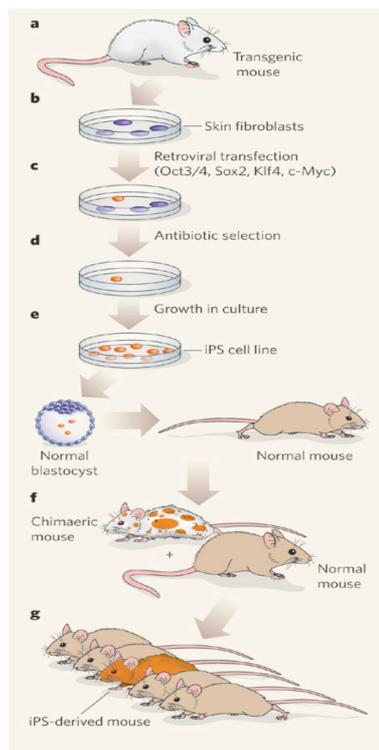


## Cellules souches « adultes »

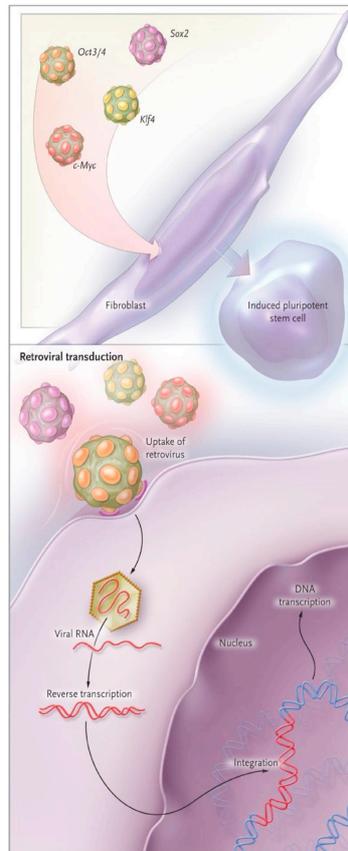


Sources : *cordon ombilical*, moelle osseuse, sang, ...

## Induction de cellules souches pluripotentes de souris par « reprogrammation » de fibroblastes de la peau



# Induction de cellules souches pluripotentes de souris par « reprogrammation » de fibroblastes de la peau



## *Applications thérapeutiques potentielles*

Maladies neurologiques

Maladie de Parkinson

Traumatismes de la moelle épinière

Maladie d'Alzheimer ?

Sclérose en plaques ?

Maladies neurodégénératives ?

Infarctus du myocarde

Diabète de type 1 (insulino-dépendant, ou juvénile)

Maladies ostéo-cartilagineuses (arthrose) ?

Reconstitution du système hématopoïétique (leucémies, SIDA,...)

Traitement des grands brûlés